Beitrag zur Kenntnis obligat anaërober Bakterien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät der Universität Leipzig

vorgelegt von

Fritz Bachmann
aus Plauen i. V.



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1912

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren Pfeffer und Chun.

Leipzig, den 16. Juli 1912.

Der Procancellar:
Fischer.

Abdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 36. Band. 1912. Nr. 1/5.

Meinen lieben Eltern.

Inhalt.

Einleitung.

Das Dogma — kein Leben ohne Atmung — erschien vollkommen sicher begründet und erfreute sich allgemeiner Anerkennung, als Pasteur der Nachweis gelang, daß es Organismen gibt, die in allen ihren Funktionen ohne freien Sauerstoff zu existieren vermögen. Diese Angabe ist denn auch lange Zeit bestritten worden. Da Pasteur in seinen Versuchen keine Sauerstoffreagentien verwendete, schien allerdings der Zweifel erlaubt, ob nicht doch in den verwendeten Kulturmedien geringe Mengen Sauerstoff vorhanden gewesen seien, die jedoch keinesfalls ausgereicht hätten, die von Pasteur erhaltenen großen Kohlensäuremengen auf dem Wege normaler Atmung zu bilden. Jeder Zweifel an der Richtigkeit der Pasteurschen Angaben mußte jedoch schwinden, als durch Lachowicz und Nencki[1]) einwandfrei festgestellt wurde, daß Bakterien ohne jede Spur chemisch nachweisbaren Sauerstoffs sich zu vermehren vermögen.

Die weiter sich ergebende Frage, ob die Anaëroben dauernd den Sauerstoff entbehren können, ist eingehend erst neuerdings von Kuersteiner[2]) untersucht worden. Mittels einer sinnreichen Methode wurden bis zu 16 Umimpfungen nacheinander ohne Luftzutritt vorgenommen. Es zeigte sich sowohl bei obligat wie fakultativ Anaëroben keine schädliche Wirkung des Sauerstoffmangels.

Die obligat Anaëroben, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigen wird, zeigen die weitere charakteristische Eigenschaft, daß sie bei vollem Zutritt der Luft d. h. bei einem Sauerstoffdruck von $^1/_5$ Atm. in ihrer Vermehrung gehindert, schließlich getötet werden. Die Konzentration des in der Nährlösung gelösten Sauerstoffs ist in diesem Falle weniger als $^1/_{1000}$ Gewichtsprozent. Der Sauerstoff ist also für die Anaëroben ein sehr starkes Gift. Doch dürfte auch für die empfindlichsten Arten eine Mindestkonzentration des Sauerstoffs existieren[3]), unterhalb deren ihre Wachstumstätigkeit nicht mehr gehemmt wird. Nach Versuchen von Beijerinck[4]) und Burri und Kuersteiner[5]) scheint der Sauerstoff in sehr geringer Konzentration auf die Bewegung und die Vermehrung obligat Anaërober sogar förderlich, stimulierend (?) zu wirken. Bei Luftzutritt lassen sich daher auch die obligat Anaëroben züchten[6]), doch nicht, wenn der Nährboden bei einem Luftdruck von 1 Atm. mit Sauerstoff gesättigt ist und bleibt, weil dann die unschädliche Mindestkonzentration schon bei weitem überschritten ist.

---

[1]) Lachowicz u. Nencki, Die Anaërobiosefrage. (Pflügers Arch. f. Phys. Bd. 33. 1884. p. 1.)

[2]) Kuersteiner, Beiträge zur Untersuchungstechnik obligat anaërober Bakterien usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 19. 1907. p. 204 ff.)

Vgl. Pasteur, Études sur la bière. 1876. p. 291.

Lachowicz u. Nencki, l. c. 1887. p. 8; weitere Angaben über fortdauernde anaërobe Züchtung obligat anaërober Bakterien sind noch vorhanden, doch wurde in diesen Fällen die Einwirkung der Luft beim Überimpfen nicht vermieden. Die Erfolge Chudiakows (s. Anm. folgender Seite), der Versuche mit Umimpfung ohne Luftzutritt ausgeführt hat, gibt Rothert nicht an.

[3]) Chudiakow, Zur Lehre von der Anaërobiose, Ref. von Rothert. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 4. 1898. p. 389 ff.)

[4]) Les organismes anaérobies ont-ils besoin de l'oxygène libre? (Arch. Néerland. Sér. II. T. 2. 1899. p. 397.)

[5]) Burri u. Kuersteiner, Bedeutung des Sauerstoffentzugs für die Entwicklung obligat anaërober Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. p. 301.)

[6]) Wuercker, Über Anaërobiose. [Dissert.] Erlangen 1910.

Die fördernde Wirkung des Sauerstoffs ist der exakten experimentellen Forschung, wenigstens auf den bisher begangenen Wegen, kaum zugänglich. Die Giftwirkung dagegen ist bei den obligat Anaëroben verglichen mit der bei Aëroben besonders leicht zu studieren, da der Sauerstoff eben schon in einer Konzentration giftig wirkt, die uns in unserer Atmosphäre stets zur Verfügung steht. Trotzdem ist auch hierüber noch keine eingehendere experimentelle Studie vorhanden und wir stehen im Grunde genommen noch auf demselben Standpunkt wie Pasteur, der die Giftwirkung des Sauerstoffs der Luft bei den obligat Anaëroben zwar konstatierte, aber nicht näher untersuchte. So z. B. ist die Zeit, innerhalb welcher der Sauerstoff der Luft tödlich wirkt, noch nicht genauer untersucht.

Der erste Versuch zur Beantwortung dieser Frage wurde zwar schon von Pasteur mit dem „vibrion butyrique“ ausgeführt[1]). Pasteur leitete durch einen in Gärung begriffenen Kolben Luft, nach ½ Stunde waren Bewegung und Gärung erloschen und kehrten auch nicht zurück, wenn nun ein Kohlensäurestrom durch die Gärflüssigkeit geschickt wurde. Ein Vergleichskolben, durch den dauernd Kohlensäure geleitet wurde, zeigte nach drei Stunden gute Beweglichkeit. Als Zeichen für den Eintritt des Todes wird also hier der Verlust der Gärfähigkeit angesehen, in diesem speziellen Falle vermutlich mit Recht.

Im Jahre 1889 gibt Luederitz[2]) einen Versuch mit Bacillus liquefaciens magnus an, der insofern einen Fortschritt bedeutet, als der Eintritt des Todes nach dem Verlust des Vermögens, Kolonien zu bilden, d. h. der Vermehrungsfähigkeit beurteilt wird. Luederitz verarbeitet mehrere Ösen sporenfreien Materials mit Gelatine zu Esmarchschen Rollröhrchen, nachdem vorher aus der beimpften Gelatine eine Öse voll in hoher Gelatine verteilt war (Kontrollkulturen kürzester Lufteinwirkung). Solcher Röhrchen wurde eine ganze Reihe angesetzt. Die Gelatine wurde nach Lufteinwirkung wieder verflüssigt und davon zur Prüfung der nunmehrigen Lebensfähigkeit je eine Öse voll in hoher Traubenzucker-Gelatine verteilt. In den Kontrollkulturen traten zahllose Kolonien auf. In den Versuchskulturen waren schon nach weniger als 2 Stunden weitaus die meisten Keime getötet: nach 2 Stunden entstanden 6 bezw. 8 Kolonien, nach 4 Stunden 0 Kolonien, nach 8 Stunden 1 und 0 Kolonien, bei längerer Zeit trat kein Wachstum ein.

Die Versuche Chudiakows[3]) bringen keinen prinzipiellen Fortschritt, doch ist die Methode exakter: Es wurden Gelatineplattenkulturen mit einer abgemessenen Menge einer jungen, keine Sporen enthaltenden Kultur infiziert. Diese blieben eine Anzahl von Stunden an der Luft oder wurden von Anfang an im Vakuum gehalten: 1stündige Einwirkung der Luft war ohne merklichen Einfluß, 4stündige sehr merklich, 15stündige vernichtete alle vegetativen Stadien.

In der Literatur sind noch einige Angaben über Sauerstoffresistenz der Anaëroben verstreut zu finden. Die Versuchsanordnung ist jedoch in diesen Fällen nicht näher angegeben oder wenig einwandfrei, so daß ich die Mitteilung der Resultate füglich unterlassen kann.

Die Unvollständigkeit der bisherigen Erfahrungen über die Sauerstoffresistenz ließ es wünschenswert erscheinen, die Frage in einer besonderen Untersuchung wieder aufzunehmen. Ich suchte also festzustellen, wie lange mindestens die atmosphärische Luft einwirken muß, damit die verschiedenen Entwicklungsstadien, speziell junge vegetative Zustände und Sporen obligat anaërober Bakterien die Fähigkeit verlieren, Kolonien zu bilden. Die Wirkung einer geringeren tödlichen Sauerstoffkonzentration, als sie unter Luft von Atmosphärendruck vorhanden ist, wurde nur bei Sporen untersucht. Für die Vegetativen ergab sich im Laufe der Untersuchungen noch die Frage, nach welcher Zeit die Beweglichkeit an Luft und — nach vorübergehender Lufteinwirkung — im Vakuum erlösche. Es wurde besonders

[1]) Pasteur, Études sur la bière. 1876. p. 292. Ein ähnlicher Versuch ist schon in der ersten Arbeit beschrieben (Animalcules infusoires viv sans gaz-oxygène libre et déterminant des fermentations. (Compt. rend. T. 52. 1861. p. 346); als Tötungszeit sind 1—2 Stunden angegeben.

[2]) Luederitz, Zur Kenntnis der anaëroben Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 5. 1889. p. 158.)

[3]) Chudiakow, l. c. 1898. p. 391.

Wert gelegt auf eingehende Kritik der Versuchsmethoden und kritische Beurteilung der Resultate.

Für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit bin ich Herrn Geheimen Rat Pfeffer zu großem Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

I. Material.

In der Hauptsache arbeitete ich mit drei streng anaëroben Arten: Bacillus amylobacter A. M. et Bredem., Bacillus botulinus van Ermeng., Paraplectrum foetidum Weigm. — mit Bacillus Chauveaui habe ich nur vereinzelte Versuche angestellt, die ich nicht bis zu einem endgültigen Resultate fortführte.

1. Bacillus amylobacter A. M. et Br. wurde nach der Vorschrift Bredemanns[1]) aus dem Erdboden isoliert. Reagenzröhrchen wurden etwa 6 cm hoch mit sterilisierter N-freier Nährlösung (Winogradsky) gefüllt, dazu wenig frische Erde aus dem botanischen Garten und etwas Schlämmkreide gegeben. Darauf wurden sie wenige Minuten in siedend heißes, jedoch nicht weiter erhitztes Wasser gestellt. Bei 28° C trat dann im Laufe von 1—2 Tagen starke Gärung und typischer Buttersäuregeruch auf. — Nach 8 Tagen wurden von diesem Rohmaterial, nachdem es zur Auslese der widerstandsfähigeren Sporen mit heißem Wasser verdünnt worden war, Oberflächenkulturen auf Platten angelegt und durch wiederholte Umimpfung Reinkulturen erhalten.

Die Kolonien sind schmutzig weiß, auf der Oberfläche des Agars[2]) kreisrund und erhaben, in der Tiefe linsenförmig, glatt begrenzt, bei dünner Aussaat bis zu 4 mm im Durchmesser, meist 1½ bis 2 mm, zumeist am dritten Tage makroskopisch wahrnehmbar (bei 28—30° C).

In tiefem Agarstich tritt ohne Entfernung des Sauerstoffes gewöhnlich kein Wachstum ein. Die Gasbildung ist sehr energisch, so daß der Agar durch Gasblasen vollkommen zerklüftet und in die Höhe getrieben wird.

In Pepton-Fleischextrakt-Gelatine (anaërob) ist das Wachstum sehr spärlich. Der Zusatz von Traubenzucker ist notwendig. Inwieweit dieser durch verwandte Stoffe vertreten werden kann, habe ich nicht untersucht. Die Gelatine wird selbst nach Wochen nicht verflüssigt (25° C).

In Traubenzucker-Bouillon erfolgt bei 31° C rasches und gutes Wachstum. Nach 12—16 Stunden ist zuweilen schon schwache Trübung zu bemerken, im Verlauf von weiteren 4—8 Stunden tritt starke Trübung und kolossale Gasbildung ein. Nach drei Tagen ist die Gärung gewöhnlich beendet und es bildet sich ein grau-weißer Bodensatz.

Die Sporenbildung geht am besten auf Traubenzucker-Agar vor sich. In Bouillon werden reife Sporen in geringerer Menge gebildet, sehr viele bleiben auf einem früheren Bildungsstadium stehen. Die Stäbchen werden bei der Sporenbildung ziemlich gleichmäßig dicker, am meisten in der Mitte, am wenigsten an den abgerundeten Enden. Keulen und Rhomboid-Formen sind selten. Die Sporen sind fast endständig. Granulose wird reichlich abgelagert, wie das schon vielfach beschrieben wurde.

---

[1]) Bredemann, Bacillus amylobacter A. M. et Br. usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 392.)

[2]) Oberflächenkolonien wurden stets nur bei Abwesenheit von Sauerstoff erhalten, das gilt natürlich auch für die anderen streng anaëroben Arten.

Die Jugendformen haben durchschnittlich folgende Dimensionen. Länge: 4,2, Breite: 1,1 μ. Die Sporenträger sind 5 μ lang und in der Mitte 1,3 μ dick; die Sporen 1,9 μ lang, 1,23 μ dick.

2. Paraplectrum foetidum Weigmann. Ich habe mir eine Kultur dieses Bacillus von Kràl verschafft und werde ihn unter dieser Bezeichnung auch anführen, obwohl von Barthel[1]) seine Identität mit dem Bacillus putrificus Bienst. nachdrücklich betont worden ist. Ich kann nach meinen rein physiologisch gerichteten Untersuchungen die Richtigkeit dieser Angabe weder bestätigen, noch bestreiten. Weigmann hat sich, so viel ich weiß, noch nicht dazu geäußert.

Die Charakteristik meines Stammes stimmt mit der des Paraplectrum foetidum Weigmanns[2]) im wesentlichen überein.

In Traubenzucker-Agar fand ich die Kolonien stets rundlich, mit Buckeln und ziemlich dicken, bei 60-facher Vergrößerung dickfädigen Ausläufern versehen.

Auf Agar gehen von einem rundlichen bräunlichen Kern weißliche, wenig dichte, ziemlich breite Ausläufer aus, die sich dendritisch verzweigen. Die Begrenzung am Ende der Ausläufer ist rund und scharf.

Die Gasbildung ist sehr gering. Weigmann gibt dagegen für sein Paraplectrum foetidum starke Gasbildung an (die Kultur in toto betrachtet), erwähnt aber für Traubenzucker-Agar zwei Typen von Kolonien: rundliche verfilzte und linsenförmige, während ich die letzteren fast nie erhalten habe. Es ist wohl möglich, daß die Form der Kolonien von der Intensität der Gasbildung abhängig ist, daß bei starker Gasproduktion durch Entstehen kleiner Spalten die Bildung linsenförmiger Kolonien begünstigt wird. Die Gasbildung ist also möglicherweise eine variable Eigenschaft des Paraplectrum foetidum und Weigmann hat zwei Rassen vor sich gehabt, die eine stark, die andere schwach gasbildend.

In tiefem Agarstich erfolgt bei Luftzutritt gutes Wachstum bei 31^{0} in 24 Stunden 1 cm unter der Oberfläche. Nach 2—3 Tagen bis zur Oberfläche vordringend.

In Gelatine-Stichkultur entstehen (anaërob) nach 4—5 Tagen gute Kolonien, dann erfolgt Erweichung, schließlich nach etwa 8 Tagen völlige Verflüssigung. Der Geruch ist unangenehm nach überreifem Käse. Das Wachstum ist mit und ohne Traubenzucker gleich kräftig.

Die Länge der Stäbchen beträgt durchschnittlich 3,3 μ. Die Sporenträger sind 2,4 bis 5,7 μ, im Durchschnitt 3,5 μ lang, 0,8 bis 1,2 μ dick. Durchschnittlich sind die jungen Stäbchen etwas dicker als ältere. Erst bei der Sporenbildung schwellen diese an einem Ende an. Die Anschwellung geht allmählich in den normalen Bakterienkörper über, so daß eine keulenartige, nicht stecknadelartige Gestalt resultiert. Die Sporen sind oval, 1,23 μ lang, 0,95 μ dick.

Die Sporenbildung geht am besten in Nährgelatine mit oder ohne Traubenzucker vor sich.

Jod färbt die Kolonien rötlich; unter dem Mikroskop ist an den einzelnen Stäbchen keine Färbung zu bemerken.

3. Bacillus botulinus van Ermeng. Ich erhielt eine Kultur aus dem hiesigen hygienischen Institut durch gütige Vermittlung des Herrn

---

[1]) Barthel, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 18.

[2]) Weigmann, Über zwei an der Käsereifung beteiligte Bakterienarten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 827.)

Dr. Schmidt. Sie stammte von einem Berliner Fall von Botulismus. Die Stoffwechselprodukte des Bacillus hatten nach Angabe des Herrn Dr. Schmidt ihre toxische Wirkung verloren.

Der Bacillus ähnelt in allem sehr dem Paraplectrum foetidum. In Traubenzucker-Agar sind seine Kolonien gelblich, rund, mit sehr zahlreichen fädigen Emergenzen. Auf Agar werden ebenfalls Ausläufer gebildet, doch wachsen an ihren Enden einzelne Bakterienfäden weiter, so daß die glatte Begrenzung verloren geht. Er wächst im Gegensatz zum Paraplectrum foetidum auch von der Oberfläche aus in den Agar hinein so daß das Abimpfen erschwert wird. Im Agarstich fallen ebenfalls die sehr zahlreichen Ausläufer auf.

In Nährgelatine sind die Verhältnisse fast gleich denen bei Paraplectrum. Die Gelatine wird verflüssigt, Vorhandensein von Traubenzucker ist unnötig.

In Bouillon ist der Niederschlag flockiger und fester als bei Paraplectrum foetidum.

Die Gasbildung ist stets gering, während sie van Ermengem[1]) als kolossale beschreibt. Ob hier der Verlust einer nur scheinbar charakteristischen Eigenschaft vorliegt, ist nicht zu entscheiden. Der Verlust der Toxizität bedeutet jedenfalls ebenso wie der der Gasbildung eine Änderung des Chemismus des Bacillus; es wäre ja möglich, daß beide Hand in Hand gehen.

Die jungen Stäbchen sind 2,6 bis 6,4 μ, im Mittel 3,6 μ lang, 0,8 μ dick. Die Sporenträger sind 4,0 bis 5,6 μ, im Mittel 4,5 μ lang, 0,6 bis 0,7 μ dick. Die Sporenbildung ist ganz wie bei Paraplectrum foetidum und geht auch in Gelatine besonders gut vor sich. Die Sporen sind 1,6 bis 1,8 μ lang und 1,2 bis 1,5 μ dick.

II. Methodik.

Von vornherein mußte ich zu einer Methode greifen, die es ermöglicht, aus meinen Versuchskulturen den Sauerstoff nach dessen Einwirkung in kurzer und bestimmbarer Zeit wieder zu entfernen. Ich arbeitete nach einem im hiesigen Institut schon seit Jahren gebräuchlichen kombinierten Verfahren, das im Prinzip schon von Wieler[2]) angegeben wurde.

Die Petrischalen oder sonstigen Kulturgefäße brachte ich unter Glocken, die bei meinem Versuche stets dreimal evakuiert und mit Wasserstoff gefüllt wurden. Mit ihrem breiten gutgeschliffenen Rande wurden sie auf plangeschliffene Glasplatten aufgesetzt (mittels einer Mischung von 50 Teilen Kolophonium, 20 Japanwachs, 30 Vaseline, die auch bei 35° genügend fest bleibt, daher beim Zusammensetzen der Glocke erwärmt werden muß.) In den Tubus der Glocke wurde ein Glashahn mittels eines Kautschukstopfens sehr fest eingefügt. Die Glocke konnte durch einen Dreiweghahn sowohl mit der Wasserstrahl-Luftpumpe als mit dem Wasserstoffapparat verbunden werden. Der Wasserstoff wurde aus arsenfreiem Zink (Prüfung nach Marsh) und Schwefelsäure in einem nach Doebereinerschem Prinzip gebauten Apparat entwickelt, das Eindringen freien Sauerstoffes

---

[1]) van Ermengem, Über einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 26. 1897. p. 40 ff.)

[2]) Wieler, Die Beeinflussung des Wachstums durch verminderte Partiärpressung des Sauerstoffs. (Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen. Heft 2. 1883. p. 194.) Vgl. die Figur bei Pfeffer, Physiologie. II. Aufl. Bd. 1. p. 542.

von der an Luft grenzenden Oberfläche der Säurelösung durch Zugabe von 1 Proz. Ferrosulfat verhindert. Zur Reinigung wurde der Wasserstoff durch U-Röhren geleitet, die mit Kalilauge bezw. Kaliumpermanganat getränkten Bimsstein enthielten. Zwischen die Glocke und den Dreiweghahn war mit Hilfe eines T-Rohres ein Quecksilbermanometer eingeschaltet, das Eindringen von Quecksilberdampf in die Leitung wurde durch eine dünne Wasserschicht im Manometerrohr verhindert. — Die Kautschukverbindungen wurden, soweit möglich, unter Wasser gesetzt und sonst auf ein Minimum reduziert, indem auf weiteren Strecken Bleirohr benutzt wurde, dessen Enden mit Siegellack in Glasröhren eingekittet, durch Kautschuksaugschlauch praktisch vollkommen luftdicht zu verbinden waren.

Regelmäßig wurde der Apparat auf dichten Schluß geprüft, indem eine größere Glocke angeschlossen, ausgepumpt und dann verbunden wurde mit der Leitung zum Wasserstoffapparat, dessen Hahn selbstverständlich geschlossen war. Durch Wiederholen des Pumpens wurde auf wenige Zentimeter evakuiert. Das Manometer sank die folgende Stunde noch ziemlich beträchtlich, da der Bimsstein das in ihm eingeschlossene Gas nur langsam abgibt. In den nächsten 20 Stunden wurde meist noch ein Sinken von 2—3 mm notiert, was auf eine auch bei peinlichster Behandlung nicht vermeidliche Undichtigkeit im Hahn des Wasserstoffapparates (Schliffehler im zentralen Teil) zurückzuführen war. Doch war das für meine Versuche ohne Belang, da ich stets die Leitung vom Wasserstoffapparat bis zum Dreiweghahn offen hielt.

Die letzten Reste des besonders aus den Kulturmedien noch entweichenden Sauerstoffs wurden durch Kalilauge und Pyrogallol entfernt, die durch eine Paraffinleiste getrennt in einer Schale unter die Glocke gebracht und erst nach dem Evakuieren vereinigt wurden. Indes bildet sich bei ruhigem Stehen an der Oberfläche leicht eine Haut von verharztem Pyrogallol, die dessen weitere Wirksamkeit hindert. Ich habe daher später außerdem unter jede Glocke eine Petrischale gebracht mit der Kultur eines fakultativ anaëroben Bacillus, der bei Luftzutritt besser gedeiht, daher den Sauerstoff begierig absorbiert. Die fertigen Glocken wurden stets bis über die gekittete Stelle unter Wasser gesetzt.

Die von mir benutzte Wasserstrahlluftpumpe saugte bei einem Wasserverbrauch von ca. 0,6 cbm pro Stunde eine Glocke von 1,5 l Inhalt in 6 Minuten bis auf 3,5 mm = 1/215 Atmosphäre ab. Bei dreimaligem Evakuieren mußte also auch der empfindlichste Anaërobe Wachstumsbedingungen finden. Ich habe die Wasserstrahlpumpe verwendet trotz den Einwänden Nabokichs[1]) gerade gegen dieses Instrument der Wielerschen Methode. Es ist ja zweifellos, daß ein Rückdiffundieren des Sauerstoffs aus dem Wasser der Luftpumpe erfolgen kann, wenn die Pumpung zu lange ausgedehnt wird. Ein Rückströmen von Sauerstoff kann bei unregelmäßigem Arbeiten der Pumpe vorkommen, auch wenn durch ein Rückflußventil das Zurückströmen des Wassers verhindert wird. Zuletzt arbeitet die Pumpe stets ruckweise, aber ich habe am Manometer nie ein Zurücksinken des Quecksilbers beobachtet, wenn man nicht Oszillationen um die Ruhelage, die bei ruckweisem Pumpen selbstverständlich sind, dahin deuten will.

In dieser Form ist die angegebene Methode sehr brauchbar und relativ

---

[1]) Nabokich, Temporäre Anaërobiose höherer Pflanzen. (Landwirtsch. Jahrb. Bd. 38. 1909. p. 71.)

bequem. Statt der Glocken Exsikkatoren zu verwenden, wird in manchen Fällen vorteilhaft sein[1]). (A. Meyer.)

Zum Umimpfen von Reinkulturen in Reagensgläschen mit Bouillon oder festen Nährböden habe ich mich mit ausgezeichnetem Erfolge der bekannten von Burri verbesserten Wrightschen Methode bedient, bei der über den sterilen Wattestopfen in geringer Entfernung ein zweiter nicht steriler geschoben wird, der zur Aufnahme von je 1 ccm 20-proz. Kalilauge und Pyrogallollösung dient. Es ist empfehlenswert, in den oberen Wattebausch seitlich eine Rinne einzudrücken, vor Zugabe der Lösungen, damit diese beim Verschluß durch den Kautschukstopfen nicht zum sterilen Wattebausch durchgepreßt werden.

Die Nährböden verwendete ich in folgender Zusammensetzung:

1. Agar 1,6 Proz., Traubenzucker 1 Proz., Pepton (Witte) 1,2 Proz., Fleischextrakt 0,8 Proz., NaCl 0,2 Proz.

2. Bouillon je 0,5 Proz. Traubenzucker, Pepton, Fleischextrakt; 0,04 Proz. Indigkarmin.

3. Gelatine 16 Proz., sonst wie bei Agar.

Die Nährböden wurden mit Na_2CO_3 schwach alkalisch gemacht.

Ich gehe nun zur Beschreibung und Kritik der speziellen Anordnung der Mehrzahl meiner Versuche über. Besondere Methoden, die bei Umimpfung ohne Luftzutritt und bei der Beobachtung der Beweglichkeit zur Anwendung kamen, werden eingangs der entsprechenden Kapitel beschrieben werden.

Meine Untersuchungen verfolgten das Ziel, das Verhalten verschiedener Entwicklungsstadien der Anaëroben zum Sauerstoff der Luft getrennt zu bestimmen. Im wesentlichen mußte es sich darum handeln, die beiden Extreme der Entwicklungsreihe, Sporen und junge vegetative Stadien zu untersuchen, da von vornherein zu vermuten war, daß diese zwei Extreme durch Zwischenglieder von kontinuierlich sich ändernden intermediären Eigenschaften verbunden sein würden.

Die erste Forderung war also, mir möglichst rein vegetatives und möglichst reines Sporenmaterial zu verschaffen. Oberflächenkulturen auf Agarplatten[1]) bieten hierbei manchen Vorteil, ihre Herstellung ist jedoch zeitraubend, auch stellten sich der Abimpfung und gleichmäßigen Verteilung der Keime Schwierigkeiten entgegen. Ich habe daher später nur noch Bouillonkulturen als Vorkulturen benutzt, die ich in Reagensröhrchen unter Wright-Burri-Verschluß ansetzte. Diese hatten allerdings ihrerseits den Nachteil, daß ich sie reichlich mit Sporen impfen mußte, wenn ich rasch kräftiges Wachstum erhalten wollte. Ich mußte gewärtig sein, daß am ersten Tage nach der Impfung noch nicht alle Sporen gekeimt seien, während im Laufe des zweiten Tages die Sporenbildung oft schon wieder einsetzte. Um die so entstehende Unsicherheit in der Beurteilung meines Materials zu beseitigen, habe ich die verschieden große Hitzeresistenz der Vegetativen und Sporen als Unterscheidungsmerkmal benutzt (s. p. 10). Selbstverständlich mußten hierbei die morphologischen und physiologischen Untersuchungen Hand in Hand gehen und einander ergänzen.

Die ersten Versuche stellte ich mit Oberflächenkulturen an, indem ich

---

[1]) Meyer, A., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1906. p. 337.

[1]) Dieser Ausdruck wird der Kürze halber angewendet, obwohl ich nur mit Petrischalen, nicht mit Glasplatten arbeitete.

eine Anzahl kräftig getrocknete, also von Kondenswasser freie Agarplatten mit einer bestimmten geringen Menge einer Bakterienaufschwemmung übergoß, bestimmte Zeit stehen ließ und dann die überstehende Flüssigkeit abschüttete. Zur Aufschwemmung verwendete ich anfangs sterilisiertes Leitungswasser, später sterilisierte Bouillon. Obwohl auf diese Weise die Wirkung des Sauerstoffs am unabhängigsten von anderweiten schädigenden Einflüssen studiert werden könnte, bin ich bald von der Verwendung von Oberflächenkulturen abgekommen, da mir die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Keime nicht befriedigend erschien. Außerdem durfte die Zahl der geimpften Keime nur gering sein, da sonst das Zusammenlaufen der Kolonien die Zählung erschwerte.

Ich ging dazu über, nach der Kochschen Methode die Keime im flüssigen Agar zu verteilen und mit ihm Platten zu gießen. Ich habe nur in seltenen Fällen von Bouillonkulturen in den Agar direkt geimpft, dagegen fast stets das Material in steriler Bouillon verdünnt. Das hatte, abgesehen von der Vermeidung zu starker Impfung, den Zweck, die Verteilung der Keime im Agar gleichmäßiger zu bekommen. Statt mit einigen Ösen unverdünnten konnte ich mit etwa 2—3 ccm verdünnten Materials den Agar versetzen. Daß hierbei die Mischung wirklich eine schnelle und vollständige ist, konnte ich in den Fällen verfolgen, in denen ich Indigkarmin-Bouillon zu den Vorkulturen oder zur Verdünnung verwendete. Der Agar färbte sich bei mäßigem Schütteln schon nach wenigen Sekunden homogen grünlich. Die Mischung wurde in Erlenmeyer Kölbchen vorgenommen, die nur zu etwa ⅓ mit Agar gefüllt waren, so daß ein kräftiges Schütteln möglich war. Es wurden dann mit einer am oberen Ende mit einem Wattestopfen verschlossenen sterilen Pipette gleiche Mengen Agars auf Petrischalen (meist drei) verteilt. Das Kölbchen mit dem Rest des Agars wurde in siedendem Wasser 1¾ bis 2¼ Minuten geschwenkt und mit diesem erhitzten Material (s. p. 7 u. 10) wurden mit einer zweiten sterilen Pipette Platten mit gleicher Quantität Agars gegossen. Zu Petrischalen von 7½ cm Durchmesser nahm ich 7 ccm Agar, so daß eine durchschnittliche Schichthöhe von 1,3 mm sich berechnet. Da der Boden der Petrischalen gewöhnlich etwas gewölbt ist, fand ich die Schicht am Rande 2 bis 2,5 mm, in der Mitte etwa 1 mm dick.

Ein paar Platten (erhitzt und nicht erhitzt) wurden sofort nach der Herstellung unter die Glocke gebracht und diese evakuiert, die übrigen blieben verschieden lange Zeit an Luft stehen unter geräumigen tubulierten Glocken, die ein Verdunsten von Wasser aus dem Agar möglichst verhindern, dagegen vollen Luftzutritt gestatten sollten. Die Petrischalen stellte ich nicht, wie es jetzt vielfach üblich ist, mit der Schichtseite nach oben, da das bei meiner Versuchsanstellung nicht vermeidliche Kondenswasser oft am Rande herablief und die Petrischale nach außen abschloß. Ich mußte das vermeiden, da sowieso der Gasaustausch zwischen dem Inneren der Glocke und der Außenluft bei ruhigem Stehen in der Hauptsache durch Diffusion also nur langsam stattfinden dürfte. Daß übrigens der Gasaustausch nicht schnell zu sein braucht, lehrt eine angenäherte Berechnung des Gewichtes des Impfmaterials und des im Agar gelösten Sauerstoffs. Die Zahl der lebensfähigen Keime betrug pro Platte höchstens 150 000. Nimmt man Stäbchen von 4 μ Länge und 1 μ Dicke und einem spez. Gewicht von 1,35 an, so ergibt sich ein Gewicht von 0,000636 mg/150 000 Keime. Das Gewicht des in 7 ccm Agar enthaltenen Sauerstoffs ist bei Sättigung unter

1/5 Atm. gleich 0,060 mg (15° C). Selbst wenn man annimmt, daß die Anaëroben pro Tag bis 50 Proz. ihres Körpergewichtes an Sauerstoff verbrauchten, so ist doch allein das Gewicht des im Agar disponiblen Sauerstoffs etwa 200mal so groß, wie das des täglich veratmeten Quantums. Der Aktionsradius eines einzelnen Stäbchens ist bei 150 000/7 ccm Agar gleich 0,224 mm. In so kleinen Räumen wird eine durch Atmung hervorgerufene Konzentrationsdifferenz sehr schnell wieder ausgeglichen. Man sieht aus dieser Betrachtung auch, daß die Dichte der Aussaat in weiten Grenzen ohne Einfluß auf die Wirksamkeit des Sauerstoffs sein muß. Ich habe das in einigen gelegentlich angestellten Versuchen bestätigen können, bei denen gleiches Material in verschiedenen Verdünnungen verwendet wurde. Die Zahl der Kolonien stand mit dem Grade der Verdünnung in reziprokem Verhältnis und zwar sowohl bei den Platten, die nur sehr kurze, als denen, die lange Zeit an Luft gestanden hatten.

Es ist nun die Frage wichtig, in welcher Zeit der in Agar gelöste Sauerstoff durch die Evakuation wieder entfernt wird. Die Bewegung des Sauerstoffs in Agar findet nur durch Diffusion statt. Der Fall ist hier zunächst der gleiche, wie bei der Diffusion zweier aneinandergrenzender Salzlösungen, bei denen fortwährend das Konzentrationsgefälle sich ändert, während die Konzentrationsdifferenz zwischen den Bewegungen des jeweiligen Diffusionszylinders die gleiche bleibt. Nehmen wir, wie das von meinen Versuchen gelten kann, einen Agarzylinder von 0,2 cm Höhe (l) und 7,5 cm Durchmesser resp. 44,2 qcm Fläche (q) an. Während der Evakuation und des Einleitens von Wasserstoff wird auf der einen Seite des Agarzylinders eine Sauerstoffkonzentration aufrechterhalten, die gegenüber der im Agar sehr gering ist, also vernachlässigt werden darf. Machen wir nun die weitere vereinfachende Annahme, daß auf der anderen Seite des Agarzylinders für eine konstante Sauerstoffkonzentration von 0,6 Vol.-Proz. gleich 0,00000858 g pro ccm gesorgt ist, so ist die in der Zeit t durch den Querschnitt fließende Menge Sauerstoff

$$\varrho = D \cdot \frac{c}{l} \cdot q \cdot t$$

wobei D der Diffusionskoëffizient für Sauerstoff in Agar ist, der mit Annäherung gleich dem in Wasser zu setzen ist (gleich 0,000019681).

Wir können nun ϱ für $t = 1$ Sekunde berechnen.

$$\varrho/\text{sec.} = 0{,}000000037341 \text{ g.}$$

In 8,82 ccm Agar sind dagegen vorhanden

$$G = 0{,}000076 \text{ g Sauerstoff.}$$

Diese Menge würde also in $t_1 = 2033{,}2$ Sek. diffundieren. Die Bedingungen für die Gültigkeit obiger Gleichung sind vorhanden. Es ändert sich jedoch bis zu dem Zeitpunkt, in dem die Diffusion gerade an der hinteren dem Glase anliegenden Fläche des Agarzylinders beginnt, die Länge des Zylinders von 0 bis 0,2 cm. Sie beträgt also im Mittel 0,1 cm. Das Konzentrationsgefälle ist demnach durchschnittlich doppelt so groß als am Ende dieser Phase. Außerdem wird in dieser Zeit nur die Hälfte des Sauerstoffs aus dem Agar heraus diffundieren. Diese erste Phase dauert also

$$t_1/4 = 508{,}3 \text{ Sek.}$$

Von diesem Zeitpunkt an wird die Konzentration an der hinteren Fläche des Agarzylinders kontinuierlich abnehmen. Hat dieselbe den halben Wert erreicht, so ist auch ϱ nur noch halb so groß wie am Ende der ersten Phase.

In diesem zweiten Zeitabschnitt wird also in der Zeiteinheit durchschnittlich $\frac{3}{4}\ \varrho$/Sek. diffundieren, im ganzen dagegen $\frac{1}{4}$ G und wir erhalten

$$\frac{G}{3\ \varrho} = \frac{t_1}{3} = 677{,}7 \text{ Sek.}$$

Berechnen wir weiter auf dieselbe Weise die Zeiten, die vom Zustandekommen der Konzentration c/2 bis c/4; c/4 bis c/8 usw. verstreichen, so finden wir, daß sie gleich sind. Es gilt dann, daß in der Zeit $n(\frac{t_1}{3})$ die Konzentration $\frac{c}{2^n}$ erreicht wird. c/1024 wird danach in fast genau 2 Stunden eingetreten sein. (10 . 677,7 + 508,3 = 7385 Sek.)

Die Zeit von Beginn der ersten bis zum Ende der dritten Evakuation betrug meist etwa 40 Minuten. $(\frac{t_1}{4} + 3\frac{t_1}{3}.)$ Der Sauerstoff war dann also durchschnittlich auf $^1/_{16}$ der ursprünglichen Konzentration verdünnt. Diese Menge verteilt sich nun bis zum Eintritt des Gleichgewichts auf das Gasvolumen unter der Glocke. Dieses Gasvolumen war in meinen Versuchen mindestens 15mal größer, als das Agarvolumen der unter der Glocke befindlichen Platten. Ist der Absorptionskoëffizient dem Henryschen Gesetze entsprechend bei sehr niedrigem Drucke wenigstens annähernd gleich dem bei 1 Atm., so ergibt sich, daß das Gleichgewicht eintritt bei einer Konzentration, die etwa $^1/_{8000}$ der anfänglichen beträgt. Dabei ist wie in den früheren Betrachtungen die Temperatur von 15° C angenommen worden. Da ich jedoch stets die Glocke nach der Evakuation sofort ins Wärmezimmer stellte, wurde der Prozeß der Diffusion beschleunigt und die Grenzkonzentration herabgesetzt. Die Verzögerung der Diffusion durch Erhöhung der Konzentration außerhalb des Agarzylinders ist sehr gering und beträgt bis zum Eintritt einer Konzentration von c/1024 selbst im ungünstigsten Falle nicht mehr als 2 Minuten.

Aus diesen Betrachtungen geht vor allen Dingen hervor, daß bis zum Eintreten einer Konzentration des Sauerstoffs die bedeutend unter der schädlichen Mindestkonzentration liegt, also sicher Wachstumsbedingungen bietet, eine bestimmte Zeit vergeht, die bei meinen Versuchsbedingungen nur abhängig ist von der Schichthöhe des Agars. Sie wird proportional dieser 60 bis 160 Minuten, durchschnittlich 80 Minuten betragen. Wenn wir diese Zeit der schädigenden Wirkung eines kontinuierlich abnehmenden Sauerstoffdruckes zu der des vollen Luftzutritts hinzurechnen, so wird die Gesamtzeit der schädlichen Wirkung eher zu lang als zu kurz bemessen sein. Der Fehler ist aber bei allen Versuchen der gleiche, vor allem ist er unabhängig von der Größe der Glocken und der Zahl der Kulturen, die ich unter einer Glocke züchtete.

Es sind nun noch einige Vorversuche zu erwähnen, auf die ich schon hingewiesen habe, nämlich über die Hitzeresistenz der Sporen. Es lag mir daran, die Dauer der Erhitzung zu erfahren, nach welcher möglichst alle Vegetative, dagegen noch möglichst wenig Sporen getötet wären. Ich wählte selbstverständlich dieselbe Versuchsanordnung, die ich bei meinen späteren Versuchen anwenden wollte. Es wurden also die Keime im verflüssigten Agar von 45 bis 50° verteilt und sofort die erste Platte mit „nicht erhitztem“ Material gegossen. Der Rest des Agars (im Erlenmeyer-Kölbchen) wurde durch Schwenken in kochendem Wasser erhitzt und während fort-

dauernder Erhitzung wurden in kurzen Zeitabschnitten gleiche Mengen Agars zum Plattenguß entnommen. Dazu wurde jedesmal eine neue sterile Pipette benutzt. Die Hitzegrade, welche bei dieser Methode erreicht werden, sind etwa folgende:

Erhitzung			Abkühlung (an Luft)		
½	Min.	60°	½	Min.	87°
1½	„	83°	1	„	82°
2	„	87°	1½	„	78°
2½	„	91°	2	„	76°
3	„	92°			

Von da ab sehr langsames Ansteigen.

Die Abkühlung geht in der Petrischale wegen der größeren Oberfläche bedeutend schneller vonstatten als in Erlenmeyer-Kölbchen, wofür die angegebenen Werte gelten.

In der folgenden Tabelle I habe ich für die erste jeweils nicht erhitzte Platte eines Versuches die absolute Zahl der entstandenen Kolonien angegeben (3. Kolumne). Wieviel Prozent von diesen nach wechselnder Erhitzungsdauer am Leben geblieben waren, ist in der 4. bis 12. Kolumne zusammengestellt.

Tabelle I.

Alter der Vorkultur in Tagen	Spezies	Nicht erhitzte 1. Platte Zahl der Kolonien	Erhitzungsdauer in Minuten Prozente der Kolonienzahl im Verhältnis zur 1. Platte								
			½	1	1½	2	3	4	5	7	8
6	Bac. botulinus	2000	70	50	—	17	—	1,3	—	0	—
13	„ „	250	—	—	—	22	2	0,25	—	—	—
22	„ „	58	—	—	—	—	1,9	—	—	—	—
3	Parapl. foetidum	2500	—	24	—	2	8	—	0	—	0
35	„ „	540	—	—	80	—	—	—	—	—	—
—	Bac. amylobacter	290	—	—	—	91	—	—	—	—	—
—	Bac. Chauveaui	350	50	41	—	—	20	—	4	0	—

Für Bacillus amylobacter liegen noch einige Versuche vor, bei denen ich ganz sporenfreies Material verwendete. Das Wachstum blieb auf allen Platten aus. Ich durfte daher annehmen, daß durch die Erhitzung von 1¾ bis 2 Minuten alle Vegetativen getötet würden, von den Sporen dagegen nur wenig. Denselben Wert konnte ich für Paraplectrum foetidum gelten lassen, da bei älterem, fast reinem Sporenmaterial nach 1½ Minuten nur 20 Proz., bei sporenärmerem dagegen etwa 80 Proz. vernichtet waren. Bei Bacillus botulinus durfte die Erhitzung 2 Minuten keinesfalls überschreiten, da nach dieser Zeit schon zu viel Sporen (13 Tage altes Material) getötet waren. Es ist übrigens auffallend, daß bei Bacillus botulinus prozentual gleichviel Keime durch dreiminütiges Erhitzen vernichtet wurden, bei 6 Tage wie bei 22 Tage altem Versuchsmaterial. Es liegt der Gedanke nahe, daß auf der nicht erhitzten Platte auch bei 6 Tage altem Material nur Sporen ausgekeimt seien.

Bezüglich der Wirkung der Temperatur des geschmolzenen Agars (ca. 45°) auf die Vegetativen verweise ich auf p. 16 u. 20.

III. Die Versuche.

A. Die Vegetativen.

1. Verhalten der vegetativen Keime gegen Einwirkung des Sauerstoffs der Luft.

Die Methode ist im allgemeinen schon auf Seite 8 beschrieben, doch muß ich noch einige Einzelheiten hinzufügen.

Die Impfung nahm ich zu Beginn meiner Untersuchungen im Dampfkasten vor, ließ aber später diese Vorsichtsmaßregel außer Acht, da ich bei ruhigem Hantieren ohne sie die gleichen Resultate erzielte. Eine Infektion erfolgte zuweilen, aber nur vom Rande her, fast stets durch Penicillium, das meist noch rechtzeitig entfernt werden konnte.

Direkt nach jedem Versuch wurde, ehe die Resultate mir bekannt waren, durch die mikroskopische Untersuchung festgestellt, ob Sporen im verwendeten Materiale vorhanden seien oder nicht. Ich fertigte mir zu diesem Zwecke Dauerpräparate an. Zur Färbung verwendete ich nach Ziehl heißes Karbolfuchsin und wusch in 1 proz. Schwefelsäure nach. Ich habe so recht genaue Resultate erzielt. Bis zu einem weiten Entwicklungsstadium ist die Spore gegen das sie umgebende Plasma unscharf abgegrenzt, und erst wenn die definitive Größe erreicht ist, wird die Sporenhaut gebildet und es entstehen scharfe Konturen. Besonders günstig sind diese Verhältnisse bei Bacillus amylobacter ausgeprägt. Die beiden anderen Arten zeigen viel mannigfaltigere Übergangsformen, die sich schwer auseinanderhalten lassen. Die sehr bequeme Jodfärbung, die bei Bacillus amylobacter in Frage käme, gibt nach meinen Erfahrungen nur ein unsicheres Kriterium über den Reifezustand der Sporen. Ganz zum Schlusse meiner Untersuchung habe ich alle Dauerpräparate noch einmal unabhängig von den Protokollen geprüft. Auf diese Weise ist für vorurteilslose und objektive Angaben Gewähr geleistet.

Die Kolonienzahl habe ich bis zu 1000 oder 1500 ohne optische Hilfsmittel durch Abzählung der ganzen Platte oder eines Quadranten oder Oktanten derselben bestimmt, höhere Zahlen mit dem Mikroskop (Leitz, Oc. 2, Obj. 3), da die Kolonien schließlich so klein blieben, daß sie mit bloßem Auge schwer zu unterscheiden waren. Der Mittelwert von mehreren Zählungen wurde notiert. Die Fehlergrenze der Zählungen ist am weitesten bei 1000 bis 2000 Kolonien, da in diesen Fällen nur deren zwei ins Gesichtsfeld fallen.

In den folgenden Tabellen II—IV habe ich die Ergebnisse derjenigen Versuche zusammengestellt, bei denen ich durch die mikroskopische Untersuchung keine Sporen konstatieren konnte. Auch solche Stäbchen, bei denen die Sporenbildung schon begonnen hatte oder etwas vorgeschrittener war, wurden noch zu den Vegetativen gerechnet.

Die in jeder wagerechten Reihe stehenden Werte stammen von einer Vorkultur und einer Verdünnung derselben. Die eingeklammerten Ziffern gelten für die erhitzten Kontrollkulturen. In der zweiten senkrechten Kolumne sind die mikroskopischen Befunde kurz angegeben. In den beiden nächsten Kolumnen ist für die jeweils kürzeste Zeit der Lufteinwirkung die absolute Zahl der Kolonien angegeben. Die Werte der folgenden Kolumnen bedeuten Prozente dieser Zahlen.

Vgl. Tab. II—IV.

Übereinstimmend habe ich von den drei untersuchten Arten in einigen Versuchen auch bei kürzester Lufteinwirkung kein Wachstum erhalten. In diesen Fällen war stets — was ich ausdrücklich erwähnen muß — auf mit

Sporenmaterial geimpften Kontrollplatten Wachstum erfolgt. Die Impfung war stets so reichlich, daß mindestens mehrere 100 bis 1000 Kolonien zu erwarten waren. Auf die Wirkung der Temperatur des geschmolzenen Agars werde ich noch eingehen (p. 16).

Tabelle II.

Paraplectrum foetidum.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	7—8 Std.	20—24 Std.	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	14 Tage	Alter der Vorkultur
1	rein vegetativ	457 (10)				0,5 (0)	0 (0)			3
2	beginnendes Wachstum	150 (40)							1,3	1
3	nur ganz junge Stäbchen	10 (0)		1 Kol. (2 Kol.)			0 (0)			4
4	ebenso	3 (0)				0 (0)				1
5	ebenso	5200 (318)		17 (28)	8,9 (17)					3
6	viel ganz junge Stäbchen	2500 (0)		11 (0)	23,2 (0)					—
7	ältere Stäbchen	0 (0)				0 (0)				2
8	Beginn der Sporenbildung		0 (0)			4 Kol.				4
9	ältere Stäbchen	0 (0)				0 (0)				2
10	wenig Sporenträger		397 (0)				0 (0)	0 —		5
11	ebenso	140 (0)			0 (0)					3
12	viel Sporenträger	4000 (12)			2,8 (0)		0,05 (0)			4
13	ebenso	2000 (12)					0 (0)			4
14	ebenso ältere Stäbchen		8 (0)				0 (0)			3
15	viel Sporenträger		0 (0)			0 (0)				2
16	Fast nur Sporenträger	0 (0)				0 0 (0) (0)				1
17	Vegetative und Sporenträger	0 (0)				0 0 (0) (0)				1

Am empfindlichsten ist Bacillus amylobacter (Tabelle IV). Bei den Versuchen 24 bis 28 blieb das Wachstum überhaupt aus. Versuch 23 ist schwer zu erklären, da ja anscheinend Sporen vorhanden waren (erhitzte Kontrolle), die nach 2- bis 5-stündiger Lufteinwirkung unmöglich getötet sein konnten. Es handelt sich um einen der ersten Versuche, die ich in dieser Richtung angestellt habe. Es liegt daher der Gedanke an einen technischen

Tabelle III.
Bacillus botulinus.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	8 Stunden	2 Tage	3 Tage	5 Tage	Alter der Vorkultur (Tage)
18a	ganz jung vegetativ	2300 (500)				104 (100)		1
18b		133 (43)				96 (150)		1
19	rein vegetativ	0 (0)			0 (0)			1
20	ganz jung	0 (0)				37 K (6)	6 K —	1
21	keine reifen Sporen		195 (5)				0 (0)	5
22	ebenso	4 (0)		0 (0)				3
23	junge Sporenstadien	450 (0)			48 (0)			4

Tabelle IV.
Bacillus amylobacter.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	1—2 Std.	3—5 Std.	6 Stunden	20 Stunden	Alter der Vorkultur (Tage)
24	junges Material		Wachstum (143)	0 (0)	0 (0)			4 Pl.[1])
25	rein vegetativ		0 (0)	0 (0)		2 K (2 K)		3
26	keine reifen Sporen			0 (0)	0 (0)			5 Pl.[1])
27	ebenso	0 (0)			0 (0)			3
28	ebenso	(0) (0)					0 (0)	1

Fehler bei der Evakuation nahe, dem das Ausbleiben des Wachstums auf dem zweiten und dritten Plattenpaar zuzuschreiben wäre. Für mich ist dieser Versuch deshalb auch die Ursache gewesen, die schon erwähnten Kontrollkulturen mit Sporenmaterial einzuführen. Ich hätte diesen zweifellos mangelhaften Versuch nicht mit in die Arbeit aufgenommen, wenn er nicht die Deutung zuließe, daß durch ein Versehen der Numerierung zwei nicht erhitzte Kulturen unter die erste Glocke gekommen seien. Es wäre das der einzige Fall, in dem ich bei der hier angewandten Methode von den vegetativen

[1]) Vorkultur in Petrischale auf Agar, alle übrigen in Bouillon unter Wright-Burri-Verschluß.

Formen des Bacillus amylobacter überhaupt Wachstum erhalten hätte.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei Paraplectrum foetidum und Bacillus botulinus. In mehreren Versuchen erfolgte sehr erhebliches Wachstum und zwar vielfach auch bei dem erhitzten Material. — Für Paraplectrum foetidum (Tabelle II) zeigt Versuch 5 wohl am deutlichsten daß die hitzeresistenten Formen keineswegs nur physiologisch vollwertige Sporen sein können, da auch bei den erhitzten Kulturen in 7 Stunden eine Abnahme der Kolonienzahl um 72 Proz. zu konstatieren ist, prozentual wenig verschieden von der im nicht erhitzten Material (83 Proz.). Aus dieser Gleichartigkeit des Verhaltens gegen die Lufteinwirkung dürfen wir, wenn wir den mikroskopischen Befund berücksichtigen, den Schluß ziehen, daß es sich auch bei den hitzeresistenten Formen großenteils um Vegetative handelt. Nach siebenstündiger Lufteinwirkung würden also noch nicht alle Vegetativen getötet sein, ebenso vermutlich nach 20 Stunden. Zunächst ist der Unterschied zwischen dem Resultat dieses Versuches und den schon erwähnten, bei denen überhaupt keine Kolonienbildung erfolgte, zweifellos auffällig. Es liegt indes hier entschieden eine Beziehung der Widerstandsfähigkeit zum Entwicklungsstadium vor. Die Versuche 1, 2, 5, 6 zeigen nur ganz junge Formen, die Versuche 12 und 13 sehr viel Sporenträger. Auch in diesen letzteren Fällen können wir, wie besonders Versuch 12 zeigt, nicht annehmen, daß wir es — bei der rapiden Abnahme der Kolonienzahl um 97 Proz. in einem Tage — nur mit reifen Sporen zu tun hätten. Die Maximaltötungszeit dürfte hier 20 Stunden kaum überschreiten.

Bei Bacillus botulinus sprechen nur die Versuche 21 und 23 dafür, daß vorgeschrittene Sporenentwicklungsstadien eine kurze Sauerstoffeinwirkung vertragen. Der Versuch 18 ist unbedingt nicht mit rein vegetativem Material ausgeführt. Das geht schon mit Sicherheit hervor aus dem Gleichbleiben der Kolonienzahl nach mehrtägiger Einwirkung der Luft. Es kann sich nun hier nur um noch nicht ausgekeimte Sporen handeln. Eine Neubildung davon kann nicht in Frage kommen. Ich impfte die Vorkultur mit einer Oese fast reinen und sehr lebenskräftigen Sporenmaterials. Man kann sich leicht überzeugen, daß damit mehr als 50 000 bis 100 000 Sporen übertragen werden. Bei Versuch 18 a habe ich nun außerordentlich stark geimpft, nämlich mit 2 ccm der Vorkultur, die eine leichte Trübung aufwies. Es hätten, wie ich mir berechnete, auf jeder Platte etwa 200 000 Kolonien entstehen müssen. 99 Proz. der geimpften Keime ist also schon nach 25-minütigem Verweilen an Luft nicht mehr entwicklungsfähig. Es bedarf keines weiteren Beweises, daß das letzte Prozent physiologisch von den übrigen different ist und daß es sich hierbei um Sporen handeln muß.

Übrigens konnte ich bei allen Versuchen der Tabellen II—IV konstatieren, daß die Zahl der Kolonien auch bei dem ersten Plattenpaar weit hinter der der geimpften Keime zurücksteht. Die Bestimmung der letzteren habe ich nicht mit viel Genauigkeit vorgenommen, die in folgender Zusammenstellung angegebenen Werte sind jedoch wahrscheinlich alle noch zu niedrig.

Bacillus botulinus.

erhalten			erwartet
2300	Versuch	18a	200 000
155	„	18b	7 000
4	„	22	10 000
450	„	23	15 000

Paraplectrum foetidum.

erhalten			erwartet
457	Versuch	1	50 000
150	„	2	7 000
5200	„	5	30 000
2500	„	6	200 000
140	„	11	5 000
2000	„	13	17 000

Aus dieser Übersicht geht vor allem wiederum hervor, daß in den Versuchen 5 und 13 relativ viel gegen Sauerstoff resistentes Material vorhanden war, das bei der mikroskopischen Untersuchung mir nicht hätte entgehen können, wenn es sich um reife Sporen gehandelt hätte.

Es ist sehr auffallend, daß die Vegetativen meiner Anaëroben in so außerordentlich kurzer Zeit durch den Sauerstoff dermaßen geschädigt werden, daß sie ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, zumal wenn das als Zeichen ihres Todes angesehen werden darf. Gegen meine bisherigen Versuche kann man vor allem einwenden, daß die Vegetativen schon durch die Temperatur des geschmolzenen Agars, die 45 bis 50° C betragen muß, wenn die Versuche beendet werden sollen, ohne daß der Agar vorzeitig erstarrt, vernichtet werden könnten. In diesem Falle würden natürlich meine bisherigen Resultate über die tödliche Wirkung des Luftsauerstoffs nichts aussagen.

Es wurden daher einige neue Versuche angestellt, die im Prinzip meinen ersten Versuchen entsprachen, welche ich nicht fortgesetzt hatte, da sie nur qualitativ über Wachstum und Nichtwachstum sicher entscheiden können. Ich verschaffte mir ganz junges Material, das so gut wie sporenfrei war und strich eine Oese davon ohne Verdünnung direkt auf eine frisch gegossene und getrocknete Agarplatte. Mit der schon fertigen Kontrollkultur (Sporenmaterial) und Pyrogallat wurde sofort evakuiert und nach 6 Tagen untersucht.

Parapl. foet.:	I. 1.	15	Min.	an Luft	15	Kolonien
„ „	2.	4	Tage	„ „	5	„
„ „	II. 1.	10	Min.	„ „	0	„
„ „	2.	10	„	„ „	0	„
Bac. botul.:	I. 1.	10	„	„ „	kräftiges Wachstum	
„ „	2.	10	„	„ „	am Beginn d. Striches	
„ „	II. 1.	15	„	„ „	8	Kolonien
„ „	2.	1	Tag	„ „	4	„
Bac. amylob.	I. 1.	10	Min.	„ „	0	„
„ „	2.	3	Tage	„ „	54	„

In diesen Versuchen ist die Temperaturerhöhung als Todesursache ausgeschlossen. Bei dem 1. Versuch mit Bac. botulinus waren im Versuchsmaterial schon reichlich Sporenträger vorhanden, so daß das kräftige Wachstum am Beginn des Striches sowohl auf höhere Widerstandsfähigkeit (s. Versuche 21 und 23 ,Tabelle III) als auf dichtere Anhäufung der Individuen zurückgeführt werden kann. Die Gefahr der Verunreinigung mit reifen Sporen ist natürlich am Beginn des Striches auch am größten. — Auf das merkwürdige Verhalten des Bac. amylobacter werde ich später noch zurückkommen. Jedenfalls haben auch seine Vegetativen nach einer Lufteinwirkung von 10 Minuten Dauer ihre Vermehrungsfähigkeit verloren.

Wir haben nun, wie ich eingehend auseinandergesetzt habe, zu der jeweiligen Zeit vollen Luftzutritts noch die im allgemeinen konstante der Wirkung eines dauernd abnehmenden Partiärdruckes des Sauerstoffs zuzurechnen,

die auch bei den letzten Versuchen mit Oberflächenkulturen nicht ganz zu vernachlässigen ist, da dort zwar nach dem Auspumpen rein statisch betrachtet, der Partiärdruck nach wenigen Minuten sehr gering ist, während doch aus der Tiefe dauernd Sauerstoff durch die Oberfläche fließt. Ich vermochte diese Zeit bedeutend abzukürzen, indem ich mit dem anaëroben Bacillus einen obligat aëroben aussäete. Jedes aërobe Stäbchen wird in seiner nächsten Umgebung eine Zone geringeren Sauerstoffdruckes schaffen und ein ihm anliegendes anaërobes Stäbchen wird dadurch sehr schnell Wachstumsbedingungen finden.

Herr Professor K. Shibata überließ mir liebenswürdiger Weise eine ausgezeichnete Reinkultur eines aëroben Bacillus unbestimmter Art, der sich von meinen Anaëroben durch seine Dimensionen sehr leicht unterscheiden ließ. Ich stellte zunächst fest, daß dieser Bacillus ohne Sauerstoff nicht zu wachsen imstande ist und stellte dann folgende zwei Versuche mit ihm an. — Ich verwendete natürlichst möglichst junges Anaërobenmaterial, impfte sehr reichlich und gab dann einige Tropfen aus einer Bouillonkultur des Aëroben zu.

Bacillus botulinus.

10 Min. an Luft	1. ohne Aërobier	ca.	78 Kol.
	2. mit „	ca.	2 000 000 „

Bacillus amylobacter.

10 Min. an Luft	1. ohne Aërobier	0 Kol.
	2. mit „	150 „
2 Tage „ „	3. ohne „	8 „

Bei Bac. botulinus zeigt das Resultat in überzeugender Weise den günstigen Einfluß des aëroben Bacillus. Auch Bac. amylobacter hat eine gewisse Förderung erfahren. Ob die 150 Kolonien aber wirklich aus vegetativen Keimen entstanden sind, ist nicht ersichtlich. Es sind ja sicher Sporen vorhanden gewesen, die möglicherweise durch Stoffwechselprodukte der Aëroben in besonderer Weise zur Keimung angeregt wurden. Auf alle Fälle ist die Zahl der nach 15 Minuten ungehinderten Luftzutritts am Leben gebliebenen vegetativen Zustände verschwindend gering.

Für Paraplectrum foetidum liegt ein entsprechender Versuch nicht vor. Es gelang mir in einigen Versuchen mit Paraplectrum mittels Natriumhydrosulfit und Indigkarmin Sauerstoffreiheit des Nährbodens zu erreichen, noch ehe er zur Evakuation unter die Glocke kam. Doch ich erhielt kein Wachstum. Gerade für diese Art sind indes alle Versuche mit Natriumhydrosulfit nicht einwandsfrei, da die von dieser Substanz in wässriger Lösung gebildeten Gase (SO_2) für Paraplectrum foetidum außerordentlich giftig sind, wie ich mich durch sofortige Sistierung der Bewegung in Hängetropfenkulturen überzeugen konnte. — Ich setzte auch Kulturen auf Agarplatten an, die schon einen Tag in Wasserstoffatmosphäre gestanden hatten und nahm die Impfung bei 6 bis 7° C vor, aber ohne Erfolg.

2. Verhalten der Vegetativen bei Umimpfung ohne Luftzutritt.

Es ist ein Nachteil der bisher beschriebenen Versuche, daß stets nur verschieden lange Einwirkungszeiten des Sauerstoffes verglichen wurden und, da ich bei Bac. botulinus nur selten, bei Bac. amylobacter überhaupt nicht sicher von Vegetativen ausgehendes Wachstum erhalten habe, mußte ich in einigen Versuchen unter sonst ähnlichen Bedingungen die Impfung ohne Luftzutritt vornehmen. Nur so konnte ich dem Einwand begegnen,

daß die Versuchsanordnung an sich, die ja in mehrfacher Beziehung die Lebensbedingungen des Impfmaterials änderte, die Vegetativen, ohne sie gerade zu töten, an der Vermehrung und damit der Kolonienbildung hinderte. Neben Kulturen ohne Luftzutritt mußte ich zu besserem Vergleiche auch solche anlegen, bei denen ich mit der hier verwendeten Methode die Einwirkung des Sauerstoffs neuerdings prüfte. Die Überimpfung in den Agar mußte jedoch auch in diesen Fällen bei Luftabschluß geschehen, sodaß, so lange der Sauerstoff einwirkte, keine schädliche unkontrollierbare Nebenwirkung im Spiele war.

Ich verwendete zu diesen Versuchen 2-Schenkelröhrchen von Λ-Form. In den einen Schenkel kamen 3½ ccm Agar, in den anderen 2 ccm Bouillon, beides mit Indigkarminblau gefärbt. Vor dem Versuch wurden Agar und Bouillon ausgekocht und dann wurde die noch heiße Bouillon mit kräftigem Sporenmaterial geimpft, der sterile Wattestopfen etwas tiefer geschoben und über ihm ein Gummistopfen mit Glasröhre fest eingedreht. Nunmehr stellte ich die Verbindung mit der Luftpumpe her und begann langsam zu pumpen, zugleich wurden die beiden Schenkel in kaltes Wasser getaucht, sodaß ein störendes Aufschäumen und Verspritzen des Nährbodens vermieden wurde.

Alle Manipulationen von der Impfung bis zum Beginn des Pumpens suchte ich sehr zu beschleunigen, damit der Luft möglichst wenig Gelegenheit geboten würde, in den Nährboden einzudringen.[1]) Nach dreimaligem Evakuieren und Einleiten von Wasserstoff wurde die Glasröhre an einer vorher ausgezogenen Stelle abgeschmolzen und das fertige 2-Schenkelröhrchen unter Wasser bei 31° gehalten.

Im Laufe des folgenden Tages trat gewöhnlich Wachstum ein. Es wurde nun bei geschlossenen Röhrchen mikroskopisch untersucht (s. p. 45), ob etwa die Sporenbildung schon begonnen hätte. Erschien das Material rein vegetativ, so wurde entweder bei geschlossenem Röhrchen in den Agar geimpft (s. u.) oder das Röhrchen wurde geöffnet und nach Einleiten von Luft — eventuell nach Verdünnung der bewachsenen Bouillon mit steriler — in fast wagerechter Lage dem Einfluß der Luft überlassen, ab und zu auch geschüttelt. Nach einiger Zeit der Lufteinwirkung wurde das Röhrchen in der beschriebenen Weise wieder evakuiert und dann erst geimpft. Zu diesem Zwecke wurde der Agar in kochendem Wasser verflüssigt, wobei der andere Schenkel vor Erhitzung geschützt wurde. Nach Abkühlung auf etwa 45° wurde ein Tropfen der Bouillonkultur durch vorsichtiges Neigen des Röhrchens übergegossen. Nachdem durch Schütteln die Keime gut verteilt waren, wurde der Agar im Wasserstrahl zur Erstarrung gebracht, und das 2-Schenkelröhrchen im Wärmezimmer unter Wasser gestellt.

In folgendem Protokollauszuge teile ich nur die Versuche mit, die methodisch, wie beschrieben, gleichartig ausgeführt wurden. Natriumhydrosulfit

---

[1]) Ich versuchte eine Zeitlang, mit Hilfe von Schützenbergers Reagens den Sauerstoff noch vollständiger zu beseitigen. Das gelang auch sehr gut, aber es zeigte sich, daß, auch wenn das als Indikator dienende Indigkarmin durch das Natriumhydrosulfit nicht ganz entfärbt wurde, eine schädliche Wirkung desselben nicht zu verkennen war. Bac. amylobacter zeigte zwar üppiges Wachstum, aber deutlich degenerative Formen, bei Paraplectrum foetidum wurde die Sporenkeimung völlig verhindert, oder doch die Zahl der keimenden Sporen verringert. Bei Anwesenheit von Natriumhydrosulfit entstehen vermutlich abnorme Stoffwechselprodukte; während der normale Geruch meiner Arten noch relativ angenehm war, stanken Hydrosulfitkulturen intensiv merkaptanähnlich. Es ist möglich, daß hierauf die Giftwirkung zurückzuführen ist.

wurde nicht mehr verwendet. Die erste Angabe über Wachstum bezieht sich auf dasjenige in der Bouillon (Vorkultur). Ist über Öffnen und Lufteinwirkung nichts besonderes angegeben, so wurde bei geschlossenem Röhrchen übergeimpft. Die Angaben nach dem Strich — gelten für das Wachstum im Agar. Die Zahl der Kolonien pro Gesichtsfeld (Leitz, Oc. 2, Obj. 3 od. 5) ist bei jedem Versuch angegeben (Abkürzung: z. B. 400/G. F.).

Die Versuche, welche an einem Tage angesetzt wurden, habe ich in Gruppen zusammengestellt (römische Ziffern), da sie mit besserem Rechte untereinander verglichen werden dürfen als mit den übrigen.

Buttersäure-Bacillus.

I.

1. Beginnendes Wachstum nur vegetativ, Impfung mit 1 Tropfen — sehr kräftiges Wachstum 400/G. F.

2. a) Kräftiges vegetatives Wachstum, geöffnet, Luft eingeleitet; zu den 2 ccm bewachsener Bouillon werden 15 ccm steriler Bouillon zugegeben (Verdünnung ungefähr 8-fach). Von diesem verdünnten Material werden zwei ccm in ein zweites 2-Schenkelröhrchen (b) gegossen und auch in dem ersten (a) nur 2 ccm Material gelassen, das übrige abgegossen.

a) 18½ Stunden an Luft — 200 Kol. ½/G. F.
b) 47 Stunden an Luft — 60 Kol. $^1/_6$/G. F.

II.

1. Beginnendes Wachstum, scheinbar nur vegetativ, Röhrchen geöffnet, Luft eingeleitet, 2½ Stunden an Luft — kräftiges Wachstum.

2. Nach 3 Wochen kräftiger Bodensatz. Versuch, das Verhalten der Sporen zu prüfen, ob und wann sie Kolonien bilden, wenn sie dem Luftzutritt nicht ausgesetzt wurden. Impfung 1 Tropfen — nach 2 Tagen beginnendes kräftiges Wachstum.

III.

1. Beginnendes Wachstum, geimpft mit 1 Tropfen — sehr kräftiges Wachstum 150/G. F.

2. Beginnendes Wachstum, geöffnet, Luft eingeleitet, an Luft: 17 Stunden — ¼/G. F.

3. Kräftiges Wachstum. Behandelt wie I 2; nach der Verdünnung sind die Keime noch etwa 5mal so dicht wie bei III 2.

a) 18 Stunden an Luft — 50/G. F.
b) 42 Stunden an Luft — $^1/_{18}$/G. F.

Paraplectrum foetidum.

IV.

1. Beginnendes Wachstum, Impfung 1 Tropfen — 330/G. F.
2. Fortgeschrittenes Wachstum, Impfung ebenso — 150/G. F.
3. Wachstum fraglich, Impfung ebenso — 50/G. F.
4. Beginnendes Wachstum. Impfung 1,2 ccm — 500/G. F.
5. Beginnendes Wachstum. Impfung 1 Tropfen — 340/G. F.
6. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 6½ Stunden — 7/G. F.
7. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 22½ Stunden — 4/G. F.
8. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 10 Minuten — 240/G. F.

Bacillus botulinus.

V.

1. Beginnendes Wachstum. Geimpft mit 1 Tropfen — 90/G. F.
2. Wachstum etwas kräftiger, gleiche Impfung — 250/G. F.
3. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 18½ Stunden — 30/G. F.
4. Gutes Wachstum, Luft eingeleitet, an Luft: 5½ Stunden — 30/G. F.

VI.

1. Kräftiges Wachstum, rein vegetativ, Luft eingeleitet, verdünnt wie I 2; an Luft: 24½ Stunden — 5/G. F.

2. Beginnendes Wachstum. Luft eingeleitet, an Luft: 24½ Stunden — 25/G. F.

VII.

1. Beginnendes Wachstum, behandelt wie I 2
a) an Luft: 5¼ Stunden — 45/G. F.
b) an Luft: 12 Minuten — 70/G. F.
2. Beginnendes Wachstum, behandelt wie I 2
a) an Luft: 15 Minuten — 40/G. F.
b) an Luft: 29 Stunden — 5/G. F.

Da die absolute Zahl der Kolonien, die bei Überimpfung ohne Luftzutritt erhalten wurde, stets außerordentlich groß war (10—50 Tausend), so war eine prozentual wesentliche Beteiligung von Sporen an der Kolonienbildung ausgeschlossen, wenn man die mikroskopische Untersuchung berücksichtigt. Bei „beginnendem Wachstum" waren stets nur ganz junge Formen ohne Andeutung von Sporenbildung zu sehen. Auch erfolgte die Kolonienbildung stets sehr schnell im Laufe des ersten Tages, während ich in früheren Versuchen (Tabelle II—IV) die Kolonien auf den unter der Glocke befindlichen Petrischalen von außen meist erst am dritten Tage zu erkennen vermochte; allerdings waren sie dann schon recht groß, so daß sie bei näherer Betrachtung sicher schon früher sichtbar gewesen wären. Doch spricht Versuch II_2 (p. 19) dafür, daß, wenigstens bei Bac. a m y l o b a c t e r, die Kolonienbildung aus Sporen wesentlich später als aus Vegetativen erfolgt.

Aus alledem geht zweifellos hervor, daß die vegetativen Zustände der drei untersuchten Arten im Agar Kolonien zu bilden vermögen, wenn sie bei der Impfung dem Sauerstoff der Luft überhaupt nicht ausgesetzt werden. Erst damit ist streng bewiesen, daß die schnelle Vernichtung der vegetativen Formen, wie wir sie in den ersten Versuchen festgestellt haben, auf die Einwirkung des Sauerstoffes zurückgeführt werden muß, und im Zusammenhang mit der Tatsache, daß die vegetativen Stadien bei Verteilung im Agar von 45° und bei Aufstrich auf Agar unter dem Einfluß des Sauerstoffs gleich schnell vernichtet wurden, (p. 16) ist zugleich dargetan, daß die Temperatur von 45° die vegetativen Zustände weder direkt wesentlich schädigt, noch die Wirkung des Sauerstoffes wesentlich unterstützt.

Andererseits zeigte sich aber, daß die Vegetativen, wenn die Schenkelröhrchen nach Beginn des Wachstums in der Bouillon geöffnet wurden, keineswegs so rasch zugrunde gingen, wie das zu erwarten war. Die Luft müßte doch in die Bouillon schneller eindringen als in den Agar und die Tötungszeit deshalb eher noch kürzer sein, als in den früheren Versuchen.

Nur bei Paraplectrum foetidum ist bis zu 6½ Stunden die Mehrzahl der Keime getötet (IV, 6 und 7). B a c. b o t u l i n u s zeigt in 24 Stunden nur eine geringe Abnahme der Kolonienzahl, ähnlich ist es bei B a c. a m y l o b a c t e r.

Ich konnte nun dadurch, daß ich die junge Bouillonkultur des einen Schenkels mit steriler Bouillon verdünnte, die Kolonienabnahme sehr beschleunigen, wie es die Versuche I, III, VI, und VII zeigen. Besonders die Versuche unter III zeigen deutlich, wie abhängig die Resistenz der vegetativen Stadien von deren Dichte ist. Nehmen wir an, daß in dem zweiten Versuche dieser Gruppe mit einem Tropfen 100 Keime (pro G. F.), im dritten 500 Keime geimpft wurden, so leben im Versuche III_2 nach 17 Stunden nur noch ¼ Proz., bei III_3 nach 18 Stunden noch 10 Proz. Der Unterschied ist so groß, daß er auch durch verschieden starke Impfung nicht erklärt werden kann. Besonders wichtig ist hierbei, daß bei III_2 das Material nicht verdünnt wurde, daß also die schnellere Vernichtung nicht etwa nur auf die Einführung von Luft mit der zur Verdünnung benutzten Bouillon zurückgeführt werden kann.

Die Verdünnung betrug in diesen Versuchen etwa das achtfache der Ausgangskultur. In den früheren Versuchen wurde nur in einem Falle auf das 22 fache, sonst stets auf mehr als das 100 fache verdünnt. Es erscheint nunmehr verständlich, daß dort die Tötungszeit der Vegetativen erheblich kürzer gefunden wurde.

Eine deutliche Vermehrung hat übrigens in den Versuchen dieses Abschnittes während des Luftzutritts selber auch bei der geringsten Verdünnung nicht stattgefunden, ein Zeichen dafür, daß sich auch hier wenigstens ein hemmender Einfluß des Sauerstoffs geltend machte.

3. Bewegung der Anaëroben bei Luftzutritt.

Die älteste von Pasteur stammende Angabe hierüber habe ich schon zitiert. Beijerinck zeigte, daß die Beweglichkeit seines Granulobacter saccharobutyricum bei Luftzutritt wesentlich gesteigert wird[1]).

Die Angaben über die Zeit, in der die Bewegung der Anaëroben an Luft sistiert wird, sind sehr verschieden. Eingehendere Arbeiten darüber existieren nicht. Ich möchte nur erwähnen, daß Schattenfroh und Graßberger die Bewegung des „beweglichen Buttersäurebacillus“ in ¼ Stunde aufhören sahen, daß dieselbe nach Durchleiten von Wasserstoff durch die Gaskammer wieder zurückkehrte. Diese Autoren entnahmen ihr Beobachtungsmaterial dem Kondenswasser von Agarkulturen und geben an, daß ein Verdünnen desselben mit ausgekochtem Wasser sehr schnell zur Sistierung der Bewegung führte.[2])

Bei manchen Anaërobenarten scheint die Bewegung an Luft unter Umständen so schnell aufzuhören, daß sie nach Fertigstellung des Präparates nicht mehr beobachtet werden kann. Allerdings ist in diesen Fällen zweifelhaft, ob das Material nicht schon unter anaëroben Bedingungen bewegungslos war. Beijerinck gibt an, und darin kann ich ihm nur beistimmen, daß die Beweglichkeit auch bei vollem Ausschluß des Sauerstoffs sehr wechselnd ist.[3])

Besonders merkwürdig liegen scheinbar die Verhältnisse bei Bacillus tetani, der nach Silvio de Grandi[4]) Geißeln in großer Zahl ausbildet und trotzdem sich weder bei Luftzutritt noch unter anaëroben Bedingungen — bei guter Vermehrung — beweglich zeigte.

Zu Beginn meiner Untersuchung hatte ich vor, die Dauer der Beweglichkeit meiner Anaëroben bei Luftzutritt zur Kontrolle für die Richtigkeit der gefundenen Tötungszeiten zu benutzen. Ich erhielt jedoch sehr wechselnde Resultate. Der sehr empfindliche Bac. amylobacter blieb oft drei bis vier Stunden, einmal sogar neunzehn Stunden beweglich, Paraplectrum foetidum meist vier bis sieben, zuweilen auch bis zwanzig Stunden. Ich hatte zu diesen Versuchen nicht oder nur wenig verdünntes Material benutzt, und bin erst durch die im letzten Abschnitt geschilderten Versuche dazu veranlaßt worden, stärkere Verdünnungen zu verwenden.

---

[1]) Beijerinck, Über die Butylalkoholgärung u. d. Butylferment. (Verh. d. Koninkl. Ak. v. Wetensch. te Amsterd. Sect. II. I. No. 10. 1893. p. 27 ff.) (Sep.-Abdr.)

[2]) Schattenfroh u. Grassberger, Über Buttersäuregärung. (Arch. f. Hyg. 42. 1902. p. 232.)

[3]) Beijerinck, l. c. 1893.

[4]) Silvio de Grandi, Beobachtungen üb. d. Geiseln d. Tet. Bac. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig.-Bd. 42. 1906. p. 103.)

Tabelle V.

Bewegung der Anaëroben.

Species	No.	Grad der Verdünnung	Dauer der Lufteinwirkung vor dem Evacuieren (Min.)	Beobachtung direkt nach Fertigstellung der Gaskammer	Zeit zwischen Fertigstellung der Gaskammern und den Beobachtungen (in Stunden) 1—2	2—3	3—4	4—6	6—8	8—10	10—20	ca. 24	48	72 u. mehr
Paraplectrum foetidum	I 1	15-fach		+ +			+				0			
	2	225-fach		+ +			0							
	3	225-fach	45	+ +			+ +				0			
	II 1	unverdünnt	8	+ +				+ +	+ +			+ + Sporen		
	2	unverdünnt		+ +				+	(+)			0		
	3	30-fach	10 (40)	+ +				+ +	+ +			+ + <		
	4	30-fach		+ +			?	0						
	III 1	unverdünnt	15	0		0		0			0	0	0	0
	2	unverdünnt		+	+			fast 0						
	3	30-fach	10 (35)	+ +			³/₅+				(+)*		< +++	+++
	4	30-fach		+ +	+ +		0							
	IV 1	unverdünnt	12	+ +	+ +	+			½+			(+)*		
	2	20-fach	12	+ +	+ +	+			0			0	0	
	3	unverdünnt	50	+ +					+	⅔+		(+)*		
	4	20-fach	50	+ +					(+)	(+)		0		
	5	unverdünnt		+ +		0								

	V 1	unverdünnt	4	+ +				+	$^3/_2$+	½+	$^3/_5$+ < 2½			
	2	unverdünnt	30	+ +			+	½+			½+ < 1½			
	3	15-fach	30	+ +			+	(+)		(+)*				
	4	Unverdünnt		+++			+ +	+		(+)	(+)	0		
	5	15-fach		+ +			(+)	(+)?		(+)?	0			
	VI 1	unverdünnt	10	+ +	+ +				+ +	⅓+ <		<<		
	2	15-fach	10	+ +						(+)	(+)	+ + < 10		
	3	unverdünnt		+ +	+ +			(+)						
	4	15-fach		+ +	+ +			0						
	VII 1	unverdünnt	15	+ +	+ +			+ +			+ (+) <			
	2	unverdünnt		+ +		+ +		0						
Bacillus amylobacter	VIII 1	unverdünnt	7	+ +		+ +		+ +			+ +	+ +	+ + Sporen	0
	2	unverdünnt		0	0	0		0			0	0	0	
	3	30-fach	27	0		+		+ +			$^1/_{40}$(+)	<	$^1/_5$++	+++ <<
	4	30-fach		0		0		0			0	0	0	0
Bacillus botulinus	IX 1	unverdünnt	7	+ +	+++						+ + <<		+ + Sporen	* Sporen
	2	unverdünnt		+ +	+		fast 0							
	3	75-fach	35	+ +	+ +		+++				+ + <<		(++)	(+) <
		75-fach		+ +	+		0							

Für die in vorstehender Tabelle wiedergegebenen Beobachtungen habe ich mich der Recklinghausenschen oder Geißlerschen Gaskammer bedient, deren Form ich als bekannt voraussetzen darf. Die breiten Seiten derselben waren in der Mitte einander soweit genähert, daß sie einen größeren Flüssigkeitstropfen gut festhielten, aber bei ruckweisem Schütteln völlig wieder ablaufen ließen. Ich konnte so die meiste Zeit über die Luft auf eine große Oberfläche wirken lassen und brauchte nur zum Zweck der mikroskopischen Untersuchung den Tropfen in den engen mittleren Teil der Kammer zu bringen.

Da die Kammern völlig aus Glas bestehen, konnte ich sie bei 150^0 sterilisieren. Die Ableitungsröhren wurden mit Wattestopfen verschlossen. Die Impfung nahm ich mit sterilisierten Kapillarpipetten vor. Es ist mir so gelungen, Infektionen mit fremden Keimen, die gerade bei diesen Versuchen sehr störend und irreführend sein können, zu vermeiden. Sollte die Luft aus der Kammer entfernt werden, so wurden an die Ableitungsröhren nach der Impfung mittels guten Kautschukschlauchs zwei Glasröhren angeschlossen, die eine meist zugeschmolzen, die andere, die mit der Luftpumpe verbunden wurde, in der Mitte ausgezogen. An dieser Stelle wurde nach dreimaligem Evakuieren und Einleiten von Wasserstoff abgeschmolzen und die Kammer fernerhin bei 31^0 unter Wasser gehalten. Es ist für den Erfolg sehr wichtig, daß die Schlauchstücke kurz vor ihrer Verwendung einige Zeit (¼ bis ½ Stunde) in Wasser ausgekocht werden.

Die Vorkulturen setzte ich stets in Bouillon mit 0,04 Proz. Indigkarmin an. Durch die Entfärbung wurde die Abwesenheit von freiem Sauerstoff angezeigt. Vor dem Oeffnen dieser Kulturen untersuchte ich den Bewegungszustand des Materials und zwar wegen der aufsteigenden Gasblasen bei schräg gestelltem Röhrchen mit umgelegten Mikroskop. Eine 32-kerzige Metallfadenlampe diente dazu als Lichtquelle. In der Nähe der Wand des Reagensgläschens ist stets eine strömungsfreie Zone vorhanden, in der man die Eigenbewegung beobachten kann. Ein Objektiv mit starker Vergrößerung und großem Objektabstand ist natürlich notwendig. Ich benutzte Wasserimmersion D* von Zeiß.

In der Tabelle V sind die auf diese Weise gewonnenen Resultate zusammengestellt. Folgende Abkürzungen habe ich dabei verwendet: +++ = sehr gute Bewegung; ++ = gute Bewegung; + = Bewegung vorhanden; + (+) = fast alle Stäbchen beweglich; (+) = nur wenige Stäbchen beweglich; ½+, ⅓+ = die Hälfte oder ein Drittel der Stäbchen ist beweglich; 0 = keine Bewegung; < = Vermehrung; << = starke Vermehrung; < 1½ = Vermehrung auf das Anderthalbfache; * = junge, gut bewegliche Stäbchen vorhanden.

Jede wagerechte Reihe gibt die Beobachtungen an einer Gaskammer wieder. Die Gaskammern, für die in der 4. Rubrik (Dauer der Lufteinwirkung bis zur Evakuation) nichts verzeichnet ist, blieben dauernd offen mit der Luft in Berührung. Andernfalls bedeuten die Zahlen die Zeit der Lufteinwirkung in Minuten von Herstellung des Hängetropfens bis zur ersten Evakuation, die eingeklammerten die Zeit vom Öffnen der Vorkultur bis zur Evakuation.

Vgl. Tabelle V.

Das Verhalten meiner Anaëroben ist zweifellos interessant. Ich verweise nur auf die Versuche III_1 und VIII_3. Um Einzelheiten zu erklären, wären aber sehr viel umfassendere systematisch durchgeführte Untersuchungen notwendig. Ich beschränke mich daher auf einige Punkte hinzuweisen. Zunächst

zeigt sich wieder deutlich der Einfluß der Verdünnung. Aber auch bei sehr weitgehender Verdünnung wird die Dauer der Bewegung relativ wenig reduziert, was ich darauf zurückführen möchte, daß auch das unverdünnte Material bei dem verwendeten geringen Flüssigkeitsquantum und der großen Oberfläche, die es der Luft bietet, der Einwirkung des Sauerstoffs fast ebenso ausgesetzt ist, wie das verdünnte Material.

Die Dauer der Bewegung an Luft ist abgesehen von Versuch VIII, bei dem Bac. amylobacter ein mir unerklärliches abnormes Verhalten zeigt, ziemlich lang, 2—5 und mehr Stunden, auch bei einer Verdünnung des Materials, die der in den Versuchen der Tabellen II—IV gleich oder nahe kommt, während dort die Tötungszeit zumeist sehr viel kürzer gefunden wurde. Dieser Widerspruch scheint sich jedoch dadurch erklären zu lassen, daß auch bei fortdauernder Bewegung die Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit schon verloren sein kann. Wie sollen wir sonst erklären, daß nach kurzer Sauerstoffeinwirkung die Vegetativen sich unter Wasserstoff noch eine zeitlang bewegen, dann aber zur Ruhe kommen, ohne sich zu vermehren, während zweifellos Wachstumsbedingungen vorhanden sind?

B. Die Sporen.

1. Verhalten der Sporen bei Einwirkung des Sauerstoffes der Luft.

Die Resultate der in den Tabellen VI bis VIII zusammengestellten Versuche sind in gleicher Weise gewonnen, wie die der Tabellen II bis IV. Sie unterscheiden sich von ihnen nur dadurch, daß schon bei der mikroskopischen Untersuchung das Vorhandensein von reifen Sporen festgestellt werden konnte.

In diesen Versuchen wird das Verhalten des erhitzten Materials von besonderer Bedeutung sein. Wir müssen bei Paraplectrum foetidum und Bac. botulinus damit rechnen, daß in den nicht erhitzten Kulturen auch Vegetative zur Entwicklung kommen. Wir werden das dann annehmen müssen, wenn das erhitzte Material sich sehr viel resistenter erweist als das nicht erhitzte. Da durch das Erhitzen ,— welches nie ganz gleichmäßig von statten gehen kann wegen der verschiedenen Wandstärke und Form der Erlenmeyerkölbchen —, in einem Falle auch vegetative Zustände noch am Leben bleiben (s. Versuch 5, Tabelle II), in einem anderen dagegen schon reife Sporen getötet werden dürften, so ist das Verhältnis, in dem die Kolonienzahlen des jeweils ersten Plattenpaares eines Versuches zueinander stehen, nicht dem Verhältnis von Sporen + Vegetativen zu Sporen gleich zu setzen.

Sind überhaupt nur gleichwertige Entwicklungsstadien zur Entwicklung gekommen, so werden sie bei verschieden langer Lufteinwirkung prozentual gleichviel Kolonien bilden. Dieser Fall wird jedoch stets nur mit Annäherung eintreten, da auch die reifen Sporen Unterschiede in ihrer Resistenz gegen Erhitzung und Sauerstoffeinwirkung aufweisen werden.

Vgl. Tab. VI—VIII.

Am einfachsten liegen die Verhältnisse bei Bac. amylobacter (Tabelle VIII). Diese Versuche bestätigen zunächst die frühere Erfahrung, daß die Vegetativen zur Kolonienbildung schon nach sehr kurzer Lufteinwirkung nicht mehr fähig sind. Das geht daraus hervor, daß auf den erhitzten Platten fast gleichkräftiges Wachstum eintrat, wie auf den nichterhitzten und daß das Verhältnis der Kolonienzahlen dieser Platten untereinander auch bei längerer Lufteinwirkung ziemlich konstant blieb.

Tabelle VI.
Paraplectrum foetidum.

No. des Versuchs.	Mikroskopischer Befund	10—60 Minuten an Luft	1—5 Std.	1 Tag	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	10 Tage	14—18 Tage	länger	Alter der Vorkultur
29	wenig Sporen	850 (0)		90 (1 K.)							5
30	reife Sporen vereinzelt	650 (0)							0.15 (0)		3
31	viel ältere Formen	1400 (45)	100 —								4
32	fortgeschrittene Sporenbildung	141		10		0.7					2
33	Sporen: Veget. 1 : 10	1164 (664)			101 (76.3)					3.5 (1)	4
34	reife Sporen und Sporenträger	1300 (0)		105 (3 K.)	58.3 (6 K.)						4
35	viel Sporen	2300 (252)					520 (3000)		(600)	26.1 (160)	5
36	ebenso	20 000 (23)			100 (150)	100 (120)					3
37	ebenso	30 000 (180)			116 (83)						4
38	viel reife Sporen und junge Formen	20 000 (610)				22 (106)					2
39	viel Sporen und sehr viel Stäbch.	16 000 (2900)					1.17 (5.6				4
40	viel reife Sporen	45 000 (3800)				(110)					2
41	ebenso	23 000 (9000)					4.8 (15.5)				2
42a	sehr viel Sporen	22 000 (9000)					0.8 (1.2)				7
42b	ebenso	90 000 (27 000)					2.3 (7.4)				7
43	ebenso	40 000 (14 000)		70.5 (100)		32.5 (14)					5
44	Fast nur Sporen	57 000 (50 000)				3 3.4)					17
45	ebenso	20 000 (11 000)			225 (350)		120 (163)	(159)	36.3	0	11

Erklärung der Tabellen VI—VIII siehe p. 25.

Eine Eigentümlichkeit tritt besonders scharf hervor, die uns schon einigemal begegnet ist (Versuche 25, Tabelle IV und I_2, p. 16). Während auf dem ersten Plattenpaar, das nach sehr kurzer Lufteinwirkung unter Wachstumsbedingungen gebracht wurde, keine Kolonien sich bildeten, geschah das überraschender Weise, wenn die Platten einige Stunden oder Tage an Luft gestanden hatten (Versuche 63, 64), aber auch wenn auf den ersten Platten Wachstum eintrat, war in den meisten Fällen bei längerer Lufteinwirkung

Tabelle VII.

Bacillus botulinus.

No. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—60 Minuten an Luft	1 Tag	2—3 Tage	4—6 Tage	7—8 Tage	9—10 Tage	14 Tage	97 Tage	Alter der Vorkultur
46a	sehr wenig Sporen sonst ganz jung	1300 (100)		92 (500)		17 (240)				1
46b		236 (80)		98 —		26 (102)				
46c		34		112		26				
47	meist Vegetation	45 000 (485)				26.7 (160)				2
48	reife Sporen selten	100 000 (1100)			0.65 —					3
49	wenig reife Sporen	16 000 (2900)				1.16 (5.6)				2
50	viel Sporenträger	1200 (4)		43 (0)	42 (1 K.)					4
51	Sporen: Vegetat. 1 : 15	7000 (385)				9.3 —				4
52	viel reife Sporen meist Vegetation	35 000 (4)		72						10
53	viel Sporen	45 000 (270)			100					2
54	viel reife und fast reife Sporen	5000 (900)						inf. (66)		3
55	ebenso	19 000 (3200)		26 (75)						10
56	viel reife Sporen	55 000 (1100)			14,5 (82					4
57	fast nur Sporen	60 000 (12 000)			33 inf.					12
58	ca. ½ Sporen	25 000 (7000)			10 (29)					11
59	viel reife Sporen	70 000 (9000)	69 (78)							3 Pl.[1])
60	ebenso	24 000 (9000)			42 (19)					2
61	fast nur reife Sporen	18 000 (12 000)		66 (75)		11 (22)	11 —	4.6 (7)	0 (0)	13
62	viel Sporen	36 000 (36 000)		400 (280)						3

eine Zunahme der Kolonienzahl zu konstatieren (Versuche 66—69 und 71—73).

Es liegt der Gedanke nahe, daß hierbei die Wirkung der Temperatur des flüssigen Agars oder — bei den erhitzten Kulturen — des siedenden Wassers in Frage käme. Da die Platten nacheinander gegossen wurden, dauerte die Temperaturerhöhung, der die Sporen ausgesetzt wurden, ver-

[1]) Siehe Anm. Tabelle IV.

Tabelle VIII.
Bacillus amylobacter.

Nr. des Versuchs	Mikroskopischer Befund	10—30 Minuten an Luft	35—60 Minuten	1—2 Stdn.	3—5 Stdn.	2—3 Tage	8—12 Tage	19 Tage	Alter der Vorkultur
63	viel Sporenträger	0 (0)		0 (0)	44k (57k)				6 Pl.
64	wenig reife Sporen	0 (0)					25k (5k)		2
65	sehr wenig reife Spor.	1000 (284						0.55 (3,3)	3
66	ebenso		78 (24				51,3 117		5
67	Sporen: Vegetat. 1:10	535 (270)			105,7 (127)	158,5 (190)			3
68	viel Sporenträger		1100 (500)		46 (100)				4
69	fast nur Sporentr.		116 (89)	191 (160)	313 (137)				3
70	reichlich Sporen	212 (66)					90 (91)		5
71	ebenso		93 (133)	75 (53)	275 (168)				3
	viel Sporen	606 (495)		136 (115)	64 (62)				3
73	ebenso	1185 (425)				102 (106)			4

schieden lange. Bei den Versuchen 63, 67—69 und 72—73 wurden die zuerst gegossenen Platten auch zuerst unter die Glocke zur Evakuation gebracht, bei den Versuchen 64—66 zuletzt. Das spricht sowohl gegen einen schädigenden, wie einen fördernden Einfluß der Temperaturerhöhung.

Wir müssen also, da sonst die Bedingungen für alle Platten die gleichen waren, an eine Wirkung des Sauerstoffes denken, in dem Sinne, daß ein Verweilen an Luft für 2—3 Tage fördernd, bei längerer Dauer schädigend wirkt. Dagegen ist es unwahrscheinlich, daß der Sauerstoff bei kürzester Wirkungsdauer (bei den ersten Platten) einen direkt schädigenden Einfluß auf die vorhandenen Sporen ausübe. Es wäre allerdings daran zu denken, daß durch stufenweise Oxydation eines in der Spore vorhandenen autoxydablen Stoffes erst eine giftige entwicklungshemmende, später eine ungiftige Verbindung entstände. Auf eine andere Erklärungsmöglichkeit werde ich auf Seite 30 eingehen.

Ich möchte noch besonders auf die auffällige Tatsache hinweisen, daß die Zahl der Kolonien bei Bac. amylobacter stets sehr klein ist, gleichgültig, ob viel oder wenig Sporen im Material vorhanden sind. Ich führe das auf die Fähigkeit des Bac. amylobacter zurück, bei der Sporenbildung reichlich Schleim zu produzieren, was beim Abimpfen und Herstellen von Präparaten recht störend sich kund gab. Es ist danach verständlich, wenn bei älterem Material selbst nach starkem Schütteln 20 und mehr Individuen zusammenbleiben und eine Kolonie bilden, während bei einem Material,

das nur wenige Prozent Sporen enthält, die Wahrscheinlichkeit gering ist, daß eine Kolonie mehreren Sporen ihren Ursprung verdankt. Die Versuche 73 und 67 zeigen dies Verhalten in typischer Weise. Bei dem einen besteht die Hälfte des Materials aus Sporen, es wurden pro Platte ca. 50 000 Keime geimpft und es entstehen etwa 1200 Kolonien, d. h. $^1/_{20}$ der zu erwartenden. Bei Versuch 67 ist nur etwa 1 Proz. Sporen vorhanden. Die Impfung bringt mehr als 85 000 Keime auf die Platte und es entstehen 350 Kolonien, also mehr als zu erwarten waren. Dieser Mehrbetrag ist auf zufällig sich summierende Fehler der Zählungen und Berechnungen zurückzuführen.

Gerade in dieser Beziehung verhalten sich Paraplectrum foetidum und Bac. botulinus ganz anders. Je nach der Menge der vorhandenen Sporen variiert die Kolonienzahl von wenigen Hundert bis zu vielen Tausend. Wir sehen schon hieraus wiederum, daß die vegetativen Stadien auch bei diesen Bazillen an der Kolonienbildung nicht oder nur wenig beteiligt sind.

Die Resistenz der Sporen von Paraplectrum foetidum bei Luftwirkung ist sehr verschieden. Nach 2—3 Tagen, meist auch nach 4—6 Tagen, merkt man noch keine deutliche Abnahme der Kolonienzahl, die nach 7—8 Tagen jedoch scharf hervortritt. Auch bei den wenigen Versuchen, bei denen zunächst ein Anstieg der Kolonienzahl zu verzeichnen war, müssen wir auf den 6. bis 8. Tag den Beginn des Absterbens der Sporen verlegen, wie es Versuch 45 deutlich zeigt. Die Prozentzahlen in den Versuchen 35 und 45 dürfen wir selbstverständlich nicht mit denen der übrigen vergleichen, da ja offensichtlich auf den ersten Plattenpaaren nur ein Teil der Sporen ausgekeimt ist. Darnach sind in den Versuchen 33 und 35 nach drei Wochen noch 3 bis 5 Proz. der Sporen keimungsfähig, nach 92 Tagen ist alles getötet(Versuch 45). In anderen Fällen ist schon nach 4—6 Tagen (Versuch 44) oder 6 bis 8 Tagen (Versuche 39, 41, 42) die Zahl der keimfähigen Sporen bis auf wenige Prozent reduziert, ohne daß die Anwesenheit von Vegetativen dafür verantwortlich gemacht werden könnte. Diese starken Unterschiede in der Resistenz sind wohl auf das Alter der Vorkulturen zurückzuführen. Es entspricht bisherigen Erfahrungen, daß die Sporen nach einer bestimmten Zeit eine maximale Resistenz erreichen und dann wieder empfindlicher werden. Dieses Maximum der Widerstandsfähigkeit wird in unserem Falle bei 4—5-tägiger Vorkultur erreicht sein. (Versuche 35 und 43).

Bei Paraplectrum foetidum brauchen wir nun in keinem Fall eine Beteiligung der vegetativen Formen an der Kolonienbildung zur Erklärung der Resultate heranzuziehen. Bei Bac. botulinus dagegen steht es wenigstens für einen Versuch sicher, daß die vegetativen Zustände zur Bildung von Kolonien beigetragen haben. Bei Versuch 48 wurden in der nicht erhitzten Kultur 100 000 Kolonien, in der erhitzten 1100 gebildet. Das Material war sehr sporenarm, nach meiner Berechnung wurden pro Platte höchstens 3500 Sporen geimpft. Nach 5 Tagen Luftzutritts sind noch 650 Kolonien zur Entwicklung gekommen, d. h. 18,4 Proz. der mutmaßlich vorhandenen Sporen. Dieser Wert stimmt recht gut überein mit dem auch sonst nach 4—8tägiger Einwirkung der Luft gefundenen.

Die Abnahme der Kolonienzahl beginnt einigemal erst nach dem zweiten (Versuch 46) oder vierten Tage (Versuch 53). In der Mehrzahl der Versuche nimmt die Zahl der Kolonien scheinbar von Anfang an stetig ab und zwar bis 20 Proz. schneller als weiterhin (s. Versuch 61). Es dürfte sich hierbei nicht um den Einfluß von vegetativen Stadien handeln, da sporenarmes

Material nicht etwa eine schnellere Abnahme der Kolonienzahl zeigt, als sporenreiches, sondern um individuelle Differenzen unter den morphologisch als Sporen charakterisierten Entwickelungsstadien. Wir müssen ja neben der morphologischen Differenzierung der Sporen noch eine physiologische Entwicklung, sozusagen ein Ausschalten der Lebenstätigkeit annehmen. Jedenfalls darf ich es als eine spezifische Eigentümlichkeit des Bac. botulinus hinstellen, daß bei ihm der Übergang von empfindlichen Entwicklungsstadien zu resistenten sehr allmählich von statten geht im Gegensatz zu Paraplectrum foetidum und besonders Bac. amylobacter.

Der fördernde Einfluß des Luftsauerstoffes (s. o.) tritt bei Paraplectrum foetidum und Bac. botulinus zu selten hervor um sichere Anhaltspunkte zu geben. Interessant ist der hierhergehörige Versuch 62 (Tab. VII) bei dem auf den ersten Platten gruppenmäßiges Wachstum stattgefunden hat. 20—30 große Kolonien waren von nach außen immer kleiner und zahlreicher werdenden umgeben. Der Grund für dieses Verhalten liegt offenbar in der verschieden langen Zeit bis zum Beginn der Keimung der einzelnen Sporen. Die großen Kolonien begannen zuerst sich zu entwickeln und hemmten durch ihre Stoffwechselprodukte zunächst ihre Umgebung, so daß dort auch nur die am schnellsten keimenden Sporen zur Kolonienbildung führten. Weiter nach außen verliert sich schließlich diese hemmende Wirkung.

Dieser Versuch gibt uns einen wertvollen Hinweis darauf, daß vorübergehende Sauerstoffeinwirkung dadurch die Zahl der Kolonien erhöhen mag, daß sie die Keimung träge keimender Sprossen beschleunigt. Die Trägheit der Keimung kann einmal rein physikalische Gründe haben (Dicke, Quellbarkeit der Sporenmembran). Da die Quellung bekanntermaßen unabhängig vom Sauerstoff erfolgt und auch die weitere Keimung bei Anwesenheit des Sauerstoffes nur stark gehemmt nicht völlig verhindert werden dürfte (s. p. 33), so läßt es sich erklären, daß Lufteinwirkung von bestimmter Dauer Differenzen in der Keimungsgeschwindigkeit ausgleichen kann, wobei der Sauerstoff nur als entwicklungshemmender Faktor in Frage kommt. Er gestattet eben die Keimung aller Sporen nur bis zu einer gewissen Grenze, die von den träge keimenden etwas später erreicht wird als von den übrigen.

Dies könnte jedoch nicht erklären, weshalb sich bei einigen Versuchen mit Bac. amylobacter auf den der Luft am kürzesten exponierten Platten überhaupt keine Kolonien bildeten. Der Gedanke, daß vorübergehende Sauerstoffeinwirkung als Reiz bei der Sporenbildung oder -Keimung notwendig sei, wurde schon durch den Versuch II_2, p. 19 als unrichtig erwiesen. Dem widerspricht auch ein Umstand, den ich bisher nicht erwähnte, nämlich der, daß die steril gebliebenen Platten kein Wachstum zeigten, auch wenn sie 6 Tage unter Wasserstoff gestanden hatten,dann an Luft und endlich wieder unter die Glocke gebracht wurden. Eine allerdings etwas gezwungene Erklärung für das rätselhafte Verhalten des Bac. amylobacter läßt sich geben, wenn wir annehmen, daß bei den hier betrachteten Versuchen das Material nur unvollkommen reife Sporen enthalten habe, die nach der Übertragung in frischen Nähragar und Entfernung der Luft zwar gute Keimungs-, jedoch keine Sporenbildungsbedingungen vorfanden, die also infolge ihres unreifen Zustandes nicht auszukeimen, wegen der Außenbedingungen aber auch nicht weiter zu reifen vermochten. — Der Sauerstoff dagegen würde die Sporenbildung begünstigen, wie das schon 1881 von Praz-

mowski[1]) angegeben und später von Matzuschita[2]) bestätigt wurde. Die unreifen Sporen würden sich also an Luft weiter entwickeln und könnten dann in Wasserstoff auskeimen. Dieser Deutungsversuch setzt jedoch die Vorstellung voraus, daß der Prozeß der Sporenbildung erst bis zu einem bestimmten Reifestadium vorgeschritten sein muß, ehe eine Auskeimung erfolgen kann.

Ein sicherer Entscheid über den Modus der fördernden Wirkung des Sauerstoffes läßt sich nach den vorliegenden Versuchen nicht geben, vielleicht ist die Sporenkeimung in verschiedener Weise von Sauerstoff beeinflußbar.

Eine Weiterentwicklung von Stäbchen zu Sporen habe ich bei allen drei Arten unter streng aëroben Bedingungen nicht wahrnehmen können; das bringt jedoch weder für noch gegen die Annahme den Beweis, daß vorgeschrittene Sporenstadien an Luft zu reifen Sporen werden können.

2. Verhalten der Sporen bei verminderter Sauerstoffpartiärpressung.

Die Versuche des letzten Abschnittes bringen nicht den Beweis, daß der Sauerstoff an der schnellen Vernichtung der Sporen wesentlich beteiligt ist. Die Platten, die zuerst dem Einfluß des Sauerstoffes entzogen wurden, bieten gegenüber den anderen keine vollwertige Kontrolle, da ja in dem Moment, in dem der Sauerstoff entfernt ist, Wachstumsbedingungen eintreten, die bei Zutritt von Luft nicht vorliegen. Das Keimen der Sporen im Vakuum zu verhindern, wäre auf verschiedene Weise möglich gewesen, durch Herabsetzen der Temperatur bis unter das Minimum oder durch nachträgliche Zugabe der Nährstoffe. Am freiesten von fremden unkontrollierbaren Einflüssen ist die Wirkung des Sauerstoffes durch Änderung seines Partiärdruckes zu studieren.

Ich habe in Tabelle IX die Versuche dieser Art zusammengestellt. Das erste Plattenpaar wurde stets möglichst schnell in Wasserstoffatmosphäre gebracht, dann eine Glocke mit dem zweiten Plattenpaar bis zu einem geringen Drucke ausgepumpt und Wasserstoff eingeleitet. Das dritte Paar blieb an Luft. Alle Kulturen wurden bei gleicher Temperatur (31^0) gehalten.

Bezüglich der Anordnung der Tabelle vergleiche p. 12. Die geringen Abweichungen bedürfen keiner Erläuterung.

Vgl. Tab. IX.

Bei 5 mm Luftdruck erfolgte bei Paraplectrum foetidum und Bac. botulinus Wachstum, bei 20 mm nicht.

In allen Versuchen ist zwischen den Kulturen, die bei verschiedenen wachstumshindernden Sauerstoffpartiärdrucken gehalten wurden, ein deutlicher Unterschied in der Kolonienzahl zu bemerken, aber während dieselbe bei Paraplectrum foetidum unter geringem Sauerstoffdrucke stets größer ist als bei höherem, ist das bei Bac. botulinus nicht der Fall. (Versuch 47, 56). Dieses Verhalten ist sehr merkwürdig und veranlaßte mich zunächst, die vorliegenden Versuche überhaupt sehr skeptisch zu betrachten. Tatsächlich ist, abgesehen von der gewünschten noch eine Bindungsungleichheit bei dem zweiten und dritten Plattenpaar vorhanden. Nachdem nämlich die einen Kulturen bei vermindertem Sauerstoffdruck gestanden hatten, wurden sie

---

[1]) Prazmowski, Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten. [Dissert.] Leipzig (H. Voigt), p. 28, 33.

[2]) Matzuschita, Teisi, Zur Physiologie der Sporenbildung der Bakterien usw. (Arch. f. Hyg. Bd. 43. 1902. p. 317.)

Tabelle IX.

No.	Spezies	10—60 Minuten	2—3 Tage	4—6 Tage	7—10 Tage	Partiärdruck der Luft
47	Bacillus botulinus	45 000 (485)			26,7 (160)	1 Atm.
					5,5 (119)	40 mm
56	„ „	55 000 (1100)		14.5 (82)		1 Atm.
				3,8 (55)		20 mm
48[2])	„ „	100 000 (1100)		0,65 (—)		1 Atm.
				0,85 (77,3)		40 mm
58	„ „	25 000 (7000)		10 (29)		1 Atm.
				100[1]) (86)[1])		5 mm
55	„ „	19 000 (3200)	26 (75)			1 Atm.
			37 (100)			25 mm
38	Paraplectrum foeti.	20 000 (610)		22 (106)		1 Atm.
				100 (2000)		40 mm
40	„ „	45 000 (3800)		— (110)		1 Atm.
				9 (126)		20 mm
42b	„ „	90 000 (27 000)			2,3 (7,4)	1 Atm.
					6,1 (27,5)	500 mm
42a	„ „	22 000 (9000)			0,8 (2,2)	1 Atm.
					1,9 (6,3)	500 mm
44	„ „	57 000 (50 000)		3 (3,4)		1 Atm.
				142[1]) (190)[1]		5 mm

auf kurze Zeit an Luft gebracht, damit sie mit den dauernd dem Luftzutritt ausgesetzten Kulturen unter einer Glocke evakuiert werden konnten.

Es widerspricht indes vollkommen den im letzten Kapitel gemachten Erfahrungen, daß eine kurze 10 Minuten selten überschreitende Sauerstoffeinwirkung Sporen zu töten imstande sei. Der Annahme, daß der Wasserstoff schädlich eingewirkt hätte, widersprechen die umgekehrten Resultate der übrigen Versuche, bei denen der Wasserstoff in gleicher Weise erzeugt wurde.

[1]) Bei 5 mm Luftdruck erfolgte Wachstum; das Maximum des Sauerstoffpartiärdruckes liegt also über 1 mm und unter 4 mm.

[2]) S. p. 56.

Das Widersprechende meiner Resultate wird sich am ehesten aufklären lassen, wenn wir eine kurze Betrachtung aufstellen, unter welchen Bedingungen der Sauerstoff überhaupt auf einen Organismus einwirken kann. Inaktiver Sauerstoff vermag weder mit Eiweiß noch mit dessen Bausteinen in Reaktion zu treten, es ist dazu stets ein Stoffwechselvorgang notwendig, in den der Sauerstoff störend oder fördernd eingreifen kann. Nun ist aber in allen bisher beschriebenen Versuchen der Sauerstoff der einzige die Keimung hindernde Faktor. Alle übrigen Wachstumsbedingungen sind vorhanden. Nun dürfen wir kaum annehmen, daß der Sauerstoff lediglich durch seine Gegenwart den Beginn der Stoffwechselvorgänge verhindern könne, die unter anaëroben Bedingungen zur Keimung der Sporen und zur Vermehrung führen. Aber selbst, wenn wir den Sauerstoff als einen negativen Katalysator gelten lassen wollen, geben wir damit zugleich zu, daß der durch ihn verzögerte chemische Vorgang auch sonst nur wesentlich schneller stattfindet und — vice versa — daß die Keimung auch bei Sauerstoff zutritt, wenn auch sehr verzögert erfolgt. Mit dem Auftreten der ersten Stoffwechselvorgänge würde dann der Sauerstoff entsprechend seiner chemischen Individualität in Aktion treten. Da aber die Wirkung der Katalysatoren innerhalb gewisser Grenzen der Menge derselben proportional ist, wird bei Verringerung des Sauerstoffdruckes relativ eine Beschleunigung des Stoffwechsels eintreten und damit müßte die Keimkraft bei geringerem Sauerstoffdruck stets schneller erschöpft sein als bei höherem. Das trifft nun im allgemeinen nicht zu.

Stellen wir uns auf den Boden der Theorie, daß der Stoffwechsel primär unabhängig vom Sauerstoff erfolgt, so müssen wir annehmen, daß der Prozeß der Keimung — von Quellung sehe ich hier ganz ab — zunächst in gleicher Weise einsetzt bei Luftzutritt wie beim Fehlen von Sauerstoff unter sonst gleichen Bedingungen, daß dann der Sauerstoff aktiv störend und zerstörend eingreift.

Unterhalb des Maximums ist der Sauerstoff nicht imstande, Keimung und Vermehrung dauernd zu verhindern. Oberhalb des Maximums wird mit der Sauerstoffkonzentration die hemmende und schädigende Wirkung höchstens bis zu einer Grenze proportional zunehmen, wenn wir als Bedingung einer Wirkung des Sauerstoffes die Einleitung der Stoffwechselvorgänge ansehen. Dadurch läßt sich zunächst in befriedigender Weise erklären, weshalb die Wirkung eines hohen Sauerstoffdruckes so unwesentlich verschieden ist von der eines 20 bis 40 mal geringeren.

Bisher haben wir nur die supra- und submaximalen Sauerstoffkonzentrationen berücksichtigt. Wie steht es nun mit dem Maximum selbst? Das „Gleichgewicht" zwischen der „Keimkraft" und der hemmenden „Kraft" des Sauerstoffes, das wir nach den bisher gemachten Voraussetzungen beim Maximum annehmen müssen, kann nur ein labiles sein, da ja der Sauerstoff dauernd verbraucht wird.[1]) Es wird daher nun die Geschwindigkeit der Sauerstoffzufuhr ausschlaggebend sein, ob eine Auskeimung und Weiterentwicklung erfolgt oder nicht. Die Vorstellung ist jedenfalls erlaubt, daß gerade dieser Wechsel der nur vom Sauerstoff abhängigen Keimungsbedingungen besonders deletär wirkt, so daß eine Erschöpfung eher erreicht wird, als bei höherem dauernd hemmenden Sauerstoffdrucke. Damit ließe sich das Verhalten des Bac. botulinus erklären.

Ich war früher der Ansicht, daß bei geringem Sauerstoffdruck die Sporen

[1]) Chudiakow, l. c. 1898. p. 389.

zwar völlig auskeimen könnten und daß dann nachträglich die jungen vegetativen Keime getötet würden. Abgesehen davon, daß ich in Gaskammerkulturen auch bei vermindertem Luftdruck keine Sporenkeimung konstatieren konnte, halte ich sie auch für unwahrscheinlich, da sie eine qualitative Änderung des Stoffwechsels mit dem Auskeimen voraussetzt.

3. Verhalten der Sporen bei vollem Luftzutritt und verschiedener Temperatur.

Die wesentliche Forderung des letzten Kapitels war es, daß eine schädliche Wirkung des Sauerstoffes den Beginn der Keimung in seiner Gegenwart voraussetzt, daß also, wenn ich so sagen darf, die guten Wachstumsbedingungen die Ursache des so überraschend schnellen Verlustes der Keimfähigkeit darstellten. Ich habe deshalb einige Versuche angestellt, bei denen ich durch Temperaturerniedrigung die Wachstumsbedingungen wesentlich verschlechterte.

Diese Versuche sind in der folgenden Tabelle X zusammengestellt, deren Anordnung der der Tabelle IX entspricht.

Die Resultate entsprechen ganz den Erwartungen. In den ersten Tagen, während deren auch bei optimaler Temperatur keine wesentliche Abnahme der keimfähigen Sporen erfolgt, ist ein Unterschied zwischen den kalt und warm gehaltenen Kulturen zweifelhaft. Nach 7—10 Tagen wird er jedoch in allen Fällen sehr deutlich, besonders bei Paraplectrum foetidum und Bac. botulinus. Die geringeren Differenzen bei Bac. amylobacter sind wohl auf die allgemein größere Resistenz seiner Sporen zurückzuführen. Zur Deutung der Resultate möchte ich nur das eine noch hinzufügen, daß durch die Erhöhung der Temperatur über das Minimum derselben nicht nur der Stoffwechsel beschleunigt wird und damit dem Sauerstoff mehr Angriffsmöglichkeiten geboten werden, sondern daß allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird, so daß der Sauerstoff auch aus diesem Grunde schädlicher wirken kann als bei niedriger Temperatur.

Im Anschluß hieran erwähne ich einige Versuche, die mir zeigen sollten, wie groß etwa die maximale Lebensdauer der Sporen bei Luftzutritt sei, wenn ihnen keine Keimungsbedingungen geboten werden. Ich sammelte im Laufe meiner Untersuchungen eine Anzahl gut bewachsener Agarkulturen an, die ich an Luft stehen und allmählich eintrocknen ließ. Die Sporen waren also durch ihre eigenen Stoffwechselprodukte und aus Nährstoffmangel am Auskeimen gehindert. Die Temperatur, bei denen ich sie aufbewahrte, betrug etwa 20° C. Von derartigem, verschieden altem Material wurden nunmehr Bouillonkulturen angesetzt. Die Impfung war stets sehr reichlich. Die Kulturen einer Spezies wurden zu besserem Vergleich unter einer Glocke evakuiert zusammen mit einem Kontrollröhrchen, das mit jungem Sporenmaterial geimpft war. Die Bouillon war mit Indigkarmin versetzt, so daß der Beginn des Wachstums leicht zu erkennen war an der beginnenden Entfärbung.

Bei den drei untersuchten Arten keimte 80 bis 500 Tage altes Material in ungefähr der gleichen Zeit und das Wachstum schritt ungefähr gleichmäßig schnell fort. Nach 1½ Jahren ist also die Grenze der Lebensdauer noch nicht erreicht. Zum Vergleich führe ich einige ältere Angaben darüber an. Chudiakow[1]) fand die Sporen von Bacterium butyricum

[1]) Chudiakow, l. c. 1898. p. 391.

Tabelle X.

Nr.	Spezies	10—60 Minuten	2—4 Tage	7—10 Tage	14 Tage	Temperatur
74	Paraplect. foetidum	800 (0)	0 (0)			31° C
			50 (0)			18° C
37	„ „	30 000 (180)	116 (195)			31° C
			83 (200)			18° C
39	„ „	16 000 (2900)		1,17 5,6)		31° C
				62,5 (62,0)		4° C
41	„ „	23 000 (9000)		4,8 (15,5)		31° C
				62 (90)		4° C
2a	„ „	150 (40)			1,3 (0)	31° C
					170 (375)	4° C
2b	„ „	1500 (550)			2,7 (7,0)	31° C
					173 (255)	4° C
62	Bacillus botulinus	36 000 (36 000)	400 (280)			31 ° C
			300 (47)			4° C
53	„ „	45 000 (270)	100 —			31 °C
			111 (174)			4° C
49	„ „	16 000 (2900)		1,16 (5,6)		31° C
				61,3 (62,0)		4° C
64	Bacillus amylobact.	0 (0)		25K. (5K.)		31° C
				81K. (8K.)		4° C
65	„ „	1000 (284)			0,5 (1,76)	31° C
					3,3 (2,1)	4° C
66	„ „	78 (24)		51,3 (117)		31° C
				73 (87,5)		4° C

bei Bruttemperatur an Luft nach 230 Tagen tot, bei Zimmertemperatur nach 260 Tagen noch lebend.

v. Hibler[1]) gibt an, daß Bac. tetani trocken in zugeschmolzenen Röhrchen, also anaërob aufbewahrt, noch nach 3 Jahren keimfähig geblieben war.

Zusammenfassung.

An der Hand der Tabellen habe ich die Resultate dieser Arbeit schon diskutiert; ich möchte an dieser Stelle daher nur kurz den Gang der Untersuchung rekapitulieren und die wesentlichen Ergebnisse zusammenfassen.

Die der Arbeit zugrunde liegende Frage lautete nach der Dauer der Lufteinwirkung, nach welcher vegetative Zustände und Sporen obligat Anaërober getötet werden. — Um den Sauerstoff möglichst intensiv auf die einzelnen Keime einwirken zu lassen, wurden diese in Nähragar gut verteilt und damit Platten in dünner Schicht gegossen. Bei dieser Versuchsanordnung kommt der Sauerstoff als einziger schädigender Faktor in Frage. Daß bei der Übertragung in Agar die Keime durch die dabei nötige Temperaturerhöhung auf 45 bis 50° nicht getötet werden, wurde durch besondere Versuche mit Überimpfung ohne Luftzutritt erwiesen (p. 17).

Es zeigte sich, daß die vegetativen Zustände der untersuchten Arten (Bac. amylobacter, Bac. botulinus, Paraplectrum foetidum) gegen Sauerstoffeinwirkung ganz überraschend empfindlich sind. Es genügte in einigen Fällen voller Luftzutritt von etwa 10 Minuten Dauer, um alle Keime zu töten (vergl. Tabellen II—IV). Diese Zeit ungehinderten Luftzutritts gibt allerdings nicht diejenige der schädigenden Sauerstoffwirkung ganz an, da durch das Auspumpen die Luft aus dem Agar nicht momentan entfernt wird. Es vergehen vielmehr 1 bis 2 Stunden, ehe eine sicher unschädliche Konzentration des Sauerstoffs herbeigeführt ist (s. p. 9 ff.). Daß man hiermit rechnen muß, geht aus einem Versuche hervor, bei dem mit dem anaëroben zugleich ein obligat aërober Bacillus ausgesät wurde. Es entstanden in diesem Falle außerordentlich viel mehr Kolonien als auf der Kontrollplatte ohne den Aëroben (s. p. 17). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vegetativen Zustände bei Verteilung in Agar unter dem Einflusse des Sauerstoffs in 10—60 Minuten vollen Luftzutritts und 1—2 Stunden allmählich abnehmenden Sauerstoffdruckes größtenteils zugrunde gehen. Dasselbe gilt bei Aufstrich auf Agar (s. p. 16). Dagegen erschien die Resistenz sehr viel größer, wenn ich die Luft auf junge Bouil-

[1]) v. Hibler, Zur Kenntnis der durch anaërobe Spaltpilze erzeugten Infektionskrankheiten usw., Centr. f. Bakt., I. Abt., Origin. 25. 1899. p. 519.

lonkulturen einwirken ließ und die Keime erst nach dem Evakuieren in Agar verteilte. Die Resistenz erwies sich hierbei indes von der Dichte des Versuchsmaterials in hohem Maße abhängig, indem durch Verdünnen der Bouillonkulturen mit steriler Bouillon die Tötungszeit wesentlich abgekürzt wurde. Da mit der Verteilung in Agar eine wesentliche Verdünnung des Materials verbunden ist, so wird es verständlich, daß die Tötungszeit davon abhängt, ob die Impfung in den Agar vor oder nach der Lufteinwirkung geschieht.

Die Dauer der Beweglichkeit bei Luftzutritt ist ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, von der Dichte der Keime abhängig. Sie beträgt meist einige Stunden, unter Umständen bis zu einem Tage. Doch genügt schon eine sehr kurze Lufteinwirkung (¼—½ Stunde) um die Mehrzahl der Individuen ihrer Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit zu berauben. Denn wenn die zur Untersuchung dienenden Kammern nach kurzem Luftzutritt mit Wasserstoff gefüllt wurden, so hörte auch hier die Bewegung der meisten Keime auf, nur in etwas längerer Zeit als unter dauerndem Luftzutritt und eine Weiterentwicklung und Vermehrung derselben trat anscheinend nicht ein.

Unterschiede in der Sauerstoffresistenz je nach dem Entwicklungsstadium habe ich nur bei Paraplectrum foetidum sicher feststellen können. Ganz junge vegetative Stadien fand ich weniger empfindlich. Bei Verteilung in Agar dürften sie teilweise bis zu 20 Stunden am Leben bleiben (Versuch 5, Tab. II). Eine ähnlich hohe Resistenz weisen ältere Stäbchen auf, bei denen die Sporenbildung schon vorgeschritten ist. Junge Sporenstadien sind dagegen sehr empfindlich. Der Übergang von empfindlichen zu resistenten Formen geht bei Paraplectrum foetidum sehr allmählich, bei Bac. amylobacter besonders plötzlich vor sich.

Die Sporen zeigen an Luft unter den gegebenen Bedingungen (Verteilung in Agar) ebenfalls keine sehr große Lebensdauer. Die Mehrzahl von ihnen ist schon nach etwa 8 Tagen nicht mehr keimfähig. Eine sehr merkwürdige Tatsache ist, daß in mehreren Versuchen die Zahl der entstehenden Kolonien (also auch der keimenden Sporen?) bis zu einer gewissen Zeit mit der Dauer der Lufteinwirkung zunahm. Ich habe versucht, diese Erscheinung aus den guten Entwicklungsbedingungen und der wachstumshemmenden Wirkung des Sauerstoffs zu erklären. Auch dafür, daß die Sauerstoffresistenz der Sporen in meinen Versuchen überhaupt sehr

gering ist, möchte ich als Erklärung heranziehen, daß der Sauerstoff der einzige entwicklungshemmende Faktor ist, während sonst alle Keimungsbedingungen vorhanden sind. Dafür spricht, daß die Wirkung des Sauerstoffs bei niedriger Temperatur sehr viel schwächer ist und vor allem, daß die Sporen, wenn sie unter den Bedingungen ihrer Entstehung (bei Nahrungsmangel und in Gegenwart ihrer Stoffwechselprodukte) an Luft aufbewahrt wurden, teilweise länger als 500 Tage keimfähig blieben.

Die vorliegenden Resultate lassen sich mit den in der Einleitung zitierten Erfahrungen von Pasteur, Luederitz und Chudiakow recht gut in Einklang bringen, doch muß man sich natürlich hüten, sie auf alle obligat Anaëroben anwenden zu wollen. Lediglich die typischen sporenbildenden Arten dürften sich den von mir untersuchten ähnlich verhalten. Die asporogenen Arten dagegen scheinen gegen Sauerstoff viel weniger empfindlich zu sein, wie aus Angaben über ihre Vitalität hervorgeht[1]), doch fragt es sich, ob nicht auch sie sehr schnell zugrunde gingen, wenn sie einer so intensiven Sauerstoffeinwirkung ausgesetzt würden, wie sie in meinen Experimenten verwendet wurde. Andererseits ist es ja möglich, daß die asporogenen Arten unter schlechten Lebensbedingungen auch Ruhestadien bilden, die morphologisch sich nicht von den wachstumstätigen Stadien unterscheiden lassen. Es würden ihnen gegenüber dann ähnliche Betrachtungen gelten, wie ich sie über den Einfluß des Sauerstoffes auf die Sporen der von mir untersuchten Arten angestellt habe.

Besonders möchte ich noch darauf hinweisen, daß es fraglich ist, inwieweit meine Ergebnisse bei anderen als den in meinen Versuchen vorhandenen Kulturbedingungen gültig bleiben, insbesondere ob den Anaëroben in der Natur eine ebenso große Empfindlichkeit zukommt, wie in meinen Experimenten. Der neuerdings von Beijerinck[2]) ausgesprochene Gedanke, daß die anaëroben Bakterien in ihrer Sauerstoffempfindlichkeit „Umstimmungen" erleiden können, ist nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Die größte Bedeutung wird aber anerkanntermaßen der Symbiose oder Metabiose mit aëroben Organismen zukom-

---

[1]) Z. B. die anaëroben Kokken, aber auch Bazillen, sind öfters nach mehreren Tagen noch überimpfbar bezeichnet. Angaben bei Jungano et Distaso, Les Anaérobies. Paris 1910.

[2]) Beijerinck, Mutation bei Mikrobien. (Folia microbiolog. Holländ. Beitr. z. ges. Mikrobiol. I. 1912. p. 13.)

men, für die ja einige sichergestellte Beispiele existieren. Sie interessiert uns besonders bei der Betrachtung meiner Resultate, da ja auch das gesellige Zusammenleben vieler Individuen einer Art als Symbiose bezeichnet werden kann. Die Abhängigkeit der Giftwirkung des Sauerstoffs von der Dichte des Bakterienmaterials erhält damit eine besondere Bedeutung[1]). Ich gehe darauf noch etwas näher ein. Da die Anaëroben den Sauerstoff verbrauchen[2]), ist die Zeit der Lufteinwirkung, nach welcher ein Individuum getötet wird, davon abhängig, mit welcher Geschwindigkeit und in welcher Menge diesem der Sauerstoff zugeführt wird. Deshalb werden die Anaëroben bei sehr dichtem Wachstum und bei kleiner dem Sauerstoff exponierter Oberfläche nicht geschädigt werden. Da sie autoxydable Stoffwechselprodukte bilden, werden diese bei geeigneter Verdünnung des Materials je nach der Größe der Oberfläche weniger oder mehr die Schädigung durch den Sauerstoff verzögern können. Gerade die Wirkung der reduzierten und reduzierenden Stoffwechselprodukte erscheint mir zum Verständnis der uns begegneten Verhältnisse wichtig. Denn sie werden ja bei der Verdünnung mit verdünnt. Sie können es hindern oder verzögern, daß der Sauerstoff überhaupt in schädigender Menge an die anaëroben Keime herantritt. Dagegen müssen wir, wie ich schon bei der Kritik der Methode darlegte, einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch durch die Anaëroben voraussetzen, wenn wir annehmen wollen, daß sie direkt durch Atmung dessen Zutritt wesentlich aufhalten und seine Konzentration herabsetzen können. Wir können uns also vorstellen, daß die Anaëroben sozusagen die Waffen gegen den Sauerstoff in ihrer Umgebung anhäufen, sie sind daher wehrlos, wenn man sie in eine andere Umgebung versetzt.

Ob die Stoffwechselprodukte der Anaëroben lediglich als Sauerstoffabsorbenten schützend wirken, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Immerhin ist es interessant, daß wir hiermit schließlich zu ganz ähnlichen Fragen gelangen, wie sie für die Symbiose obligat Anaërober mit anderen Bakterien längst gestellt worden sind. Kedrowsky[3]) hat zuerst den Zweifel an der Pasteurschen Annahme ausgesprochen, daß die aëroben Bakterien ledig-

---

[1]) In diesem Sinne sind vielleicht die Erfolge Kitts zu erklären. (Die Züchtung des Rauschbrandbacillus bei Luftzutritt, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. 17. 1895.)

[2]) Chudiakow, l. c. 1898, p. 389.

[3]) Kedrowsky, Über die Bedingungen, unter welchen anaërobe Bakterien auch bei Gegenwart von Sauerstoff existieren können. (Zeitschr. f. Hyg. 20. 1895. p. 358.)

lich durch Verbrauch des Sauerstoffs den Anaëroben Existenzbedingungen schaffen. Es erscheint mir aber erst durch Versuche Bienstocks[1]) erwiesen zu sein, daß obligat anaërobe Bakterien durch Stoffwechselprodukte eines Sauerstoffzehrers zu Wachstum bei Luftzutritt zu bringen sind. Wie diese Stoffwechselprodukte wirken, ist noch völlig unbekannt.

Zum Schluß möchte ich noch kurz darauf eingehen, ob wir aus den Resultaten dieser Arbeit schon irgendwelche Schlüsse auf die Art der Giftwirkung des Sauerstoffs ziehen können. Ich habe schon darauf hingewiesen (s. p. 31—32), daß der Protoplast kaum direkt vom Sauerstoff beeinflußt werden kann, sondern daß die Voraussetzung zu einer Einwirkung desselben Stoffwechselvorgänge sind.

Der außerordentlich schnelle Verlust der Vermehrungstätigkeit macht es wahrscheinlich, daß der Sauerstoff unmittelbar in den Stoffwechsel der Anaëroben eingreift. Kruse[2]) äußert die Ansicht, daß bei Gegenwart von Sauerstoff die obligat Anaëroben einen für sie giftigen Stoff bilden. Derselbe müßte in sehr kurzer Zeit entstehen und wenn wir nicht annehmen wollen, daß eine Vorstufe von ihm in größerer Menge schon präformiert sei, so ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß er sich als Stoffwechselendprodukt bis zu letaler Dosis anhäufen kann. Es hängt dann im Grunde nur von der Bestimmung des Begriffes Stoffwechsel ab, ob man von einer direkten oder indirekten Beeinflussung desselben durch den Sauerstoff sprechen will.

Die nunmehr naheliegende Frage, welcher Teil des Stoffwechsels besonders oder ausschließlich vom Sauerstoff beeinflußt wird, ist natürlich auf Grund meiner physiologischen Untersuchung nicht zu beantworten. Die restlose Aufklärung der zuletzt berührten Probleme wird schließlich, wie so vieles, chemischen Untersuchungen vorbehalten sein. Ich hoffe aber wenigstens durch meine Arbeit gezeigt zu haben, daß auch auf rein experimentell-physiologischem Wege zur Klärung der Anaërobiosefrage, zur Präzisierung der Fragestellung noch viel getan werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Botanischen Institut der Universität Leipzig ausgeführt. Es sei mir gestattet, dessen Vorstand, Herrn Geheimen Rat Pfeffer, für die reiche Förderung, die er meiner Arbeit

[1]) Bienstock, Anaérobies et symbiose. (Ann. de l'Inst. Pasteur. 17. 1903. p. 850.)

[2]) Kruse, Allgemeine Mikrobiologie 1910. * 31.

jederzeit angedeihen ließ, auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank auszusprechen. Außerdem bin ich den Assistenten des Instituts, den Herren Swart und Privatdozent Dr. Buder, vor allem aber Herrn Professor Dr. Miehe für seine wertvollen Ratschläge bei Abfassung der Arbeit zu herzlichem Danke verpflichtet.

Leipzig, den 3. Juni 1912.



Lebenslauf.

Ich, Heinrich Volkmar Fritz Bachmann, bin am 26. Dezember 1887 in Plauen i./V. geboren, evang.-luth. Konfession. In meinem Geburtsorte verbrachte ich auch meine erste Jugend- und Schulzeit. Nach Vorbildung auf der höheren Bürgerschule trat ich 1898 in das Städtische Realgymnasium zu Plauen über, das ich 1907 mit dem Zeugnis der Reife wieder verließ.

Ich widmete mich dem Studium der Naturwissenschaften, das erste Semester in München, die übrige Zeit in Leipzig. Während desselben besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der Herren Baeyer, Doflein, Goebel, Paul, Ranke in München und der Herren Barth, Buder, Chun, Correns, Credner, Dittler, Drucker Hantzsch, Jungmann, Lehmann, Miehe, Nathansohn, Pfeffer, Rassow, Rinne, Schmarsow, Sieglbauer, Volkelt, Wagner, Wiener, Woltereck, Wundt und Zirkel in Leipzig.